

Aus dem Center for Cardiovascular Research  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der intrinsischen Aktivität potentieller AT<sub>2</sub>-Rezeptor  
Agonisten in differenzierten THP-1-Makrophagen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Leon Alexander Danyel

aus Berlin

Datum der Promotion: 02.03.2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstract (Englisch)</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract (Deutsch)</b> .....	<b>8</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1 Der Angiotensin Typ 2 Rezeptor im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System .....	9
1.2 Der AT <sub>2</sub> -Rezeptor als pharmakologischer Angriffspunkt .....	10
1.3 Neuroprotektive Effekte der AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Stimulation .....	11
1.4 Entwicklung von AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Agonisten zur Behandlung von ZNS-Erkrankungen ..	14
1.5 Etablierung eines IL-6-Assays zur Bestimmung agonistischer Aktivität am AT <sub>2</sub> - Rezeptor .....	16
<b>2 Materialien und Methodik</b> .....	<b>18</b>
2.1 Materialien .....	18
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	18
2.1.2 Chemikalien und Substanzen .....	19
2.1.3 Kits .....	21
2.1.4 Zellkulturmedien und -zusätze .....	21
2.1.5 Puffer und Lösungen .....	22
2.2 Methodik .....	25
2.2.1 Zellkultur der THP-1-Zellen .....	25
2.2.2 Stimulationsexperimente .....	26
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden .....	37
2.2.5 Statistische Berechnungen.....	39
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
3.1 Bestimmung der AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Protein-Expression in THP-1-Monozyten und -Makrophagen .....	40
3.1.1 Einfluss der PMA-induzierten Zelldifferenzierung auf die AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Protein- Expression in THP-1-Zellen.....	40
3.1.2 Einfluss von C21 auf die AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Protein-Expression in THP-1- Makrophagen.....	41
3.1.3 Einfluss von LPS auf die AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Protein-Expression in THP-1- Makrophagen.....	41

3.2	Stimulationsexperimente: Bestimmung der IL-6-mRNA-Expression in LPS-stimulierten THP-1-Makrophagen .....	41
3.2.1	Einfluss von LPS auf die IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen .....	42
3.2.2	Einfluss von C21 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen.....	43
3.2.3	Einfluss von VR0008 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen.....	44
3.2.4	Einfluss von JS5090 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen.....	45
3.2.5	Einfluss von L162-389 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen.....	46
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>48</b>
4.1	PMA-abhängige Zelldifferenzierung, LPS und AT <sub>2</sub> -Agonisten als Einflussfaktoren auf die AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Protein-Expression in THP-1-Zellen.....	49
4.1.1	Die PMA-abhängige Differenzierung von THP-1-Monozyten zu Makrophagen führt zu Steigerung der AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Protein-Expression .....	49
4.1.2	Einfluss der AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Stimulation auf die AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Expression.....	49
4.1.3	Die Stimulation von THP-1-Makrophagen mit LPS führt zur Reduktion der AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Protein-Expression .....	50
4.2	Evaluierung potentieller AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Agonisten mittels IL-6-Assay.....	50
4.2.1	Bewertung der Pharmazeutika hinsichtlich ihrer Aktivität am AT <sub>2</sub> -Rezeptor.....	50
4.2.2	Problematik der Nutzung von PD123319 zum Nachweis AT <sub>2</sub> -Rezeptor-abhängiger Effekte .....	51
4.2.3	Methodische Heterogenität und Störfaktoren des THP-1-Assays in der Literatur ..	53
4.2.4	Vereinheitlichung des THP-1-Assays zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit ..	54
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>69</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>71</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
A. cerebri media	Arteria cerebri media
ADH	Antidiuretisches Hormon
Akt	Proteinkinase B
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT <sub>1</sub> -Rezeptor	Angiotensin II Rezeptor Typ 1
AT <sub>2</sub> -Rezeptor	Angiotensin II Rezeptor Typ 2
AT <sub>2</sub> R-KO	Angiotensin II Rezeptor Typ 2-Knock-Out
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	bicinchoninic acid/Bicinchoninsäure
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Bovines Serumalbumin
C21	Compound 21
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CT	cycle threshold
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethyldicarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DSMZ	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	extracellular-signal regulated kinase
FBS	Fetal Bovine Serum/Fetales Kälberserum
i.c.v.	intracerebroventrikulär
IFN- $\beta$	Interferon- $\beta$

---

IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
iNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
i.p.	intraperitoneal
LPS	Lipopolysaccharide
MAP1B	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1B
MAP-2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MDB	Membrane Desalting Buffer
mean	Mittelwert
MIP-1 $\beta$	macrophage inflammatory protein-1 $\beta$
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MrGD	Mas-related G-protein-coupled receptor, member D
mRNA	messenger RNA
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NGF	Nerve Growth Factor/Nervenwachstumsfaktor
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate-Buffered Saline/Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
P-GP	P-Glykoprotein
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIPA-Puffer	Radio-Immunoprecipitation Assay-Puffer
RNA	Ribonucleic acid/Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute/Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s.	siehe
SD	Standartabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor

TRIF	Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN- $\beta$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trk	tropomyosin receptor kinase A
vgl.	vergleiche
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Abstract (English)

**Background:** Accumulating evidence suggests tissue-protective properties of pharmacological AT<sub>2</sub>R-stimulation in various animal models of cerebral and cerebrovascular disease. Further investigation of the neuroprotective properties of pharmacological AT<sub>2</sub>R-stimulation is hindered, because common AT<sub>2</sub>R-agonists like CGP42112 and the non-peptide agonist Compound 21 cannot penetrate the blood-brain barrier. Therefore, a new generation of blood-brain barrier-penetrating AT<sub>2</sub>R-agonists is being developed. New substances, designed through chemical alteration of established molecules, need to be reevaluated for AT<sub>2</sub>R-affinity and intrinsic activity. Common assays available, e. g. the Neurite-Outgrowth-assay are considered to be unreliable on the grounds of subjective analysis and imprecise quantification of results. Therefore, this project aimed at establishing a reliable and robust in vitro screening of potential AT<sub>2</sub>R-agonists for intrinsic activity at the AT<sub>2</sub>R based on determining interleukin 6 (IL-6) mRNA expression in THP-1-macrophages.

**Methods:** AT<sub>2</sub>R-protein expression in THP-1-monocytes was compared with AT<sub>2</sub>R-protein expression in PMA-differentiated THP-1-macrophages using Western-Blot analysis. Effects of LPS- (50 ng/ml) and Compound 21- (1  $\mu$ M) incubation on AT<sub>2</sub>R-protein-expression in THP-1-macrophages were evaluated. THP-1-macrophages were incubated with LPS (50 ng/ml), co-treated with the novel agents JS5090, L162-389 and VR0008 (1  $\mu$ M each) for 6 hours and IL-6-mRNA expression determined by qPCR. AT<sub>2</sub>R-agonist Compound 21 was used for reference. AT<sub>2</sub>R-agonism was postulated if the substance in question attenuated the increase of LPS-induced IL-6-mRNA expression. The AT<sub>2</sub>R -antagonist PD123319 (10  $\mu$ M) was used to confirm AT<sub>2</sub>R -specificity of observed effects.

**Results:** PMA-induced differentiation of THP-1 monocytes to macrophages increased expression of the AT<sub>2</sub>R-receptor-protein tenfold in Western Blot analysis (single experiment,  $p = 0,0002$ ). Incubation with LPS and Compound 21 each significantly decreased AT<sub>2</sub>R-receptor-protein-expression (single experiment,  $p = 0,0001$  and  $p = 0,0008$  respectively). Treatment of THP-1 macrophages with JS5090, L162-389, VR0008, or Compound 21 did not result in consistent, significant effects on LPS-induced IL-6-mRNA-expression.

**Conclusion/discussion:** JS5090, L162-389 and VR0008 could not be verified as AT<sub>2</sub>R-receptor agonists. Since the established AT<sub>2</sub>R-Agonist Compound 21 also did not elicit consistent effects on LPS-induced IL-6-mRNA-expression in our assay, we conclude that the tested assay was of limited validity probably due to unpredictable effects of PMA-induced differentiation and LPS-incubation of THP-1-macrophages. Future protocols should be optimized to achieve controlled and inter-experimentally consistent PMA-induced differentiation of THP-1-monocytes. In conclusion, the current IL-6-THP-1-assay has to be regarded as not suitable for the screening of potential AT<sub>2</sub>R-receptor agonists.

## Abstract (Deutsch)

**Hintergrund:** Tierexperimentelle Evidenz deutet auf protektive Effekte der pharmakologischen Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors des RAAS im Rahmen zerebraler und zerebrovaskulärer Erkrankungen. Die Evaluation neuroprotektiver Effekte wird jedoch dadurch erschwert, dass etablierte AT<sub>2</sub>-Agonisten wie CGP42112 und der Nicht-Peptid-Agonist Compound 21 die intakte Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können. Daher wird die Entwicklung neuer, ZNS-gängiger AT<sub>2</sub>-Agonisten angestrebt. Die durch strukturelle Alteration eines Ausgangsmoleküls gewonnenen, neuen Substanzen müssen auf ihre Affinität zum Zielrezeptor und ihre intrinsische Aktivität geprüft werden. Das bislang überwiegend verwendete Assay, das auf dem Auswachsen von Neuriten *in vitro* basiert, ist durch einen subjektiven Auswertungsprozess und schlecht quantifizierbare Ergebnisse benachteiligt. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines zuverlässigen, gut quantifizierbaren und automatisiert auswertbaren *in-vitro* Screenings zur Prüfung der intrinsischen Aktivität potentieller AT<sub>2</sub>-Agonisten. Grundlage des Assays bildete die Bestimmung der Interleukin 6-Expression in THP-1-Makrophagen.

**Methoden:** Die Protein-Expression des AT<sub>2</sub>-Rezeptors wurde zwischen THP-1-Monozyten und PMA-differenzierten THP-1-Makrophagen mittels Western Blot verglichen. Des Weiteren wurden die Effekte einer Inkubation von THP-1-Makrophagen mit LPS (50 ng/ml) und/oder Compound 21 (1 µM) auf die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression untersucht. Die intrinsische Aktivität der Substanzen JS5090, L162-389 und VR0008 am AT<sub>2</sub>-Rezeptor wurde über die Hemmung der LPS-induzierten IL-6-mRNA-Expressionssteigerung in THP-1-Makrophagen mittels qPCR gemessen. Als Referenzsubstanz diente der etablierte AT<sub>2</sub>-Agonist Compound 21. Die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Spezifität etwaiger Effekte wurde mittels Hemmung der beobachteten Effekte durch den AT<sub>2</sub>-Antagonisten PD123319 sichergestellt.

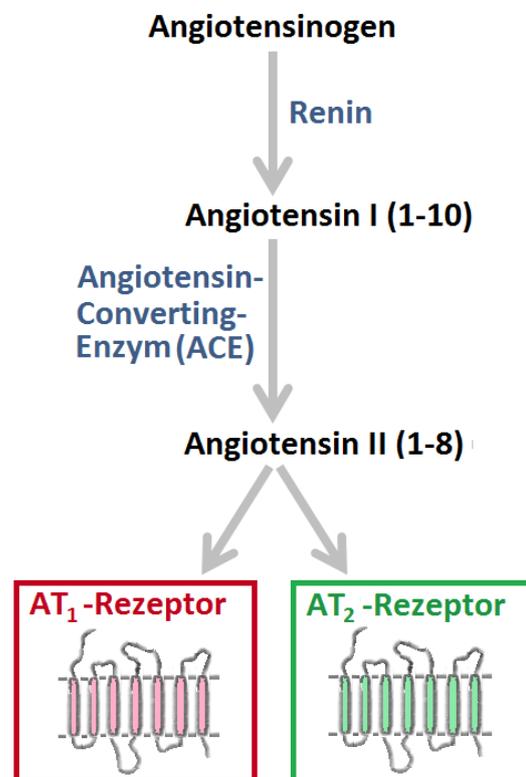
**Ergebnisse:** Die PMA-abhängige Differenzierung von THP-1-Monozyten zu -Makrophagen führte zu einer Verzehnfachung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression im Western Blot (Einzelexperiment,  $p = 0,0002$ ). Sowohl die direkte AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation, als auch die LPS-Inkubation von THP-1-Makrophagen induzierten eine signifikante Absenkung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression (Einzelexperiment,  $p = 0,0001$ ; bzw.  $p = 0,0008$ ). JS5090, L162-389, VR0008 und Compound 21 konnten keine reproduzierbare, signifikante Beeinflussung der LPS-induzierten IL-6-mRNA-Expressionssteigerung in THP-1-Makrophagen bewirken.

**Fazit/Diskussion:** Die Substanzen JS5090, L162-389 und VR0008 konnten nicht als AT<sub>2</sub>-Agonisten verifiziert werden. Ferner zeigte die Referenzsubstanz Compound 21 keine konsistente Beeinflussung der LPS-induzierten IL-6-mRNA-Expression. Die Validität des verwendeten Assays wird somit am ehesten durch die interexperimentelle Heterogenität der Effekte der PMA-abhängigen Differenzierung von THP-1-Monozyten und der LPS-Stimulation von THP-1-Makrophagen eingeschränkt. Zukünftige Protokolle sollten daher mit dem Ziel optimiert werden, eine kontrollierte und interexperimentell konsistente PMA-abhängige Differenzierungen der THP-1-Monozyten zu gewährleisten. Aktuell ist das IL-6-THP-1-Assay als Screening-Verfahren für potentielle AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten ungeeignet.

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Angiotensin Typ 2 Rezeptor im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Bis zur Identifizierung des Angiotensin AT<sub>2</sub>-Rezeptors im Jahr 1989<sup>1,2</sup> galt der Angiotensin AT<sub>1</sub>-Rezeptor als Hauptvermittler der hormonellen Wirkung von Angiotensin II im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS, s. Abb. 1). Das Prohormon Angiotensinogen ist ein von der Leber synthetisiertes Blutplasma protein und wird zunächst über Renin zum inaktiven Peptid Angiotensin I gespalten. Die Protease Renin selbst wird in Zellen des Juxtaglomerulären Apparats der Niere synthetisiert und in das Blut-Kreislaufsystem abgegeben. Die Konversion von Angiotensin I in das aktive Oktapeptid Angiotensin II erfolgt durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), v. a. an Endothelzellen der Lungen- und Nierengefäße. Angiotensin II bindet mit hoher Affinität an den AT<sub>1</sub>-Rezeptor, der zur Gruppe der sieben-transmembranären, G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehört und in beinahe allen Geweben des menschlichen Organismus exprimiert wird. Die „klassischen“ physiologischen Effekte des AT<sub>1</sub>-Rezeptors stehen im Dienst der Regulation von Blutdruck, Wasser- und Elektrolythaushalt. Sie umfassen Vasokonstriktion, positive Inotropie und Chronotropie über Aktivierung des Sympathikus, renale Natrium- und Wasserretention sowie zentralnervöse Steuerung der Salz- und Wasseraufnahme. Angiotensin II stimuliert zudem die Freisetzung der Hormone Aldosteron und Antidiuretisches Hormon (ADH) aus Nebennierenrinde<sup>3</sup> und Hypothalamus. Gut belegt ist die Beteiligung der AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Achse an der Pathogenese moderner Zivilisationskrankheiten, wie Arterieller Hypertonie, Arteriosklerose oder Herzinsuffizienz<sup>4</sup>. Das RAAS ist zu einem der wichtigsten pharmakologischen Angriffspunkte innerhalb des Formenkreises kardiovaskulärer Erkrankungen<sup>5</sup> geworden. ACE-Inhibitoren und AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten gehören zu den am häufigsten verschriebenen Therapeutika in diesem Bereich.



**Abb. 1:** Der AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptor im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Unsere Vorstellung vom RAAS als rein kardiovaskuläres Regulationssystem hat sich in den letzten 20 Jahren entscheidend verändert. Neben dem oben beschriebenen zirkulierenden RAAS ist die Existenz „lokaler RAAS“ in zahlreichen Geweben, wie z.B. in Niere, Haut, ZNS und Gastrointestinaltrakt bestätigt worden<sup>6</sup>. Innerhalb dieser Systeme ist die AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Achse u. a.

über pro-inflammatorische, pro-fibrotische und pro-proliferative Effekte an pathophysiologischen Prozessen beteiligt, die über das Spektrum der Herz-Kreislauf-Erkrankungen hinausgehen<sup>7-11</sup>.

Die Identifizierung des AT<sub>2</sub>-Rezeptors und die Charakterisierung seiner Effekte hat sich durch zwei Eigenschaften des Rezeptors im Besonderen als Herausforderung erwiesen: Zum einen weist der AT<sub>2</sub>-Rezeptor ein vom AT<sub>1</sub>-Rezeptor stark abweichendes Expressionsmuster mit nur spärlicher Expression im adulten, im Gegensatz zur starken Expression im fetalen Gewebe<sup>3</sup> auf. Zum anderen führt die pharmakologische Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors nicht zu den „klassischen“, AT<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Effekten, sondern zeigt gegensätzliche, den AT<sub>1</sub>-Rezeptor antagonisierende<sup>12</sup> Wirkungen. So hemmt der AT<sub>2</sub>-Rezeptor die Zellproliferation<sup>13-15</sup>, u. a. über eine Modulation der Apoptose<sup>16-18</sup>, fördert die Zelldifferenzierung<sup>13,19,20</sup> und weist anti-entzündliche<sup>21,22</sup> sowie anti-fibrotische Eigenschaften<sup>23-26</sup> auf. Interessanterweise kommt es im Rahmen pathophysiologischer Prozesse wie Myokardischämie, Niereninsuffizienz, ischämischem Hirninfarkt und traumatischer Nervenläsion zur Expressionssteigerung des AT<sub>2</sub>-Rezeptors<sup>3</sup> in den betroffenen Geweben. Darüber hinaus haben tierexperimentelle Studien in verschiedenen, präklinischen Krankheitsmodellen deutliche Evidenz für einen therapeutischen Effekt der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation erbracht<sup>12,27</sup>. Mittlerweile etabliert sich das Konzept einer „protektiven RAAS-Achse“<sup>28</sup>, die sowohl den AT<sub>2</sub>- als auch den Mas-Rezeptor, dessen natürlichen Liganden Angiotensin-(1-7) und das Angiotensin-Converting-Enzym 2 umfasst (s. Abb. 2). Infolgedessen steigt das wissenschaftliche Interesse an einer therapeutischen Nutzung dieses Systems.

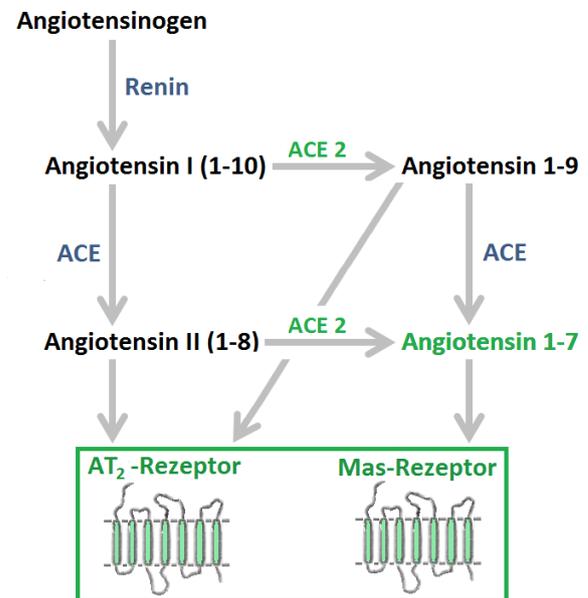


Abb. 2: Die protektive Achse des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

## 1.2 Der AT<sub>2</sub>-Rezeptor als pharmakologischer Angriffspunkt

Die Untersuchung AT<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelter Effekte wurde durch den Mangel geeigneter AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten erschwert. Der natürliche Ligand des AT<sub>2</sub>-Rezeptors, Angiotensin II, ist mit nahezu gleichwertiger Affinität für den AT<sub>1</sub>- und den AT<sub>2</sub>-Rezeptor nur bedingt geeignet, AT<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelte Effekte zu identifizieren<sup>29</sup>: Die Behandlung von Zellen oder Organismen mit Angiotensin II resultiert in der Regel in einem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Effekt, da dieser im adulten Gewebe weitaus stärker exprimiert wird<sup>29</sup>. Ein praktischer Lösungsansatz ist die Administration von Angiotensin II unter AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blockade, jedoch ist die vollständige AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blockade vor allem in vivo oft schwierig. Mit der Einführung selektiver AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten ist die Untersuchung AT<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelter Effekte

erleichtert worden. Das synthetische Peptid CGP42112 wurde v. a. in den frühen Jahren AT<sub>2</sub>-Rezeptor-bezogener Forschung genutzt<sup>1</sup>. CGP42112 ist ein partieller Agonist am AT<sub>2</sub>-Rezeptor, der bei Anwesenheit eines reinen Agonisten als Antagonist wirken kann<sup>15</sup>. Peptide sind hinsichtlich ihrer kurzen Halbwertszeit im Organismus und der notwendigen parenteralen Verabreichung problematisch für In-vivo-Versuche. Dies gilt auch für weitere peptidische AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten wie LP2-3<sup>30</sup>, [Y]<sup>6</sup>-AII<sup>31</sup>, Novokinin<sup>32,33</sup>, sowie durch Aminosäuren-Substitution abgeänderte Angiotensine<sup>34</sup>. CGP42112 wurde nie für die Entwicklung zum Medikament in Betracht gezogen<sup>35</sup>. C21 ist als erster, oral-verfügbare, selektiver AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist im Jahr 2004 durch Wan et al. synthetisiert worden und stellt bis heute den einzigen nicht-peptidischen Vertreter in der Gruppe der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten<sup>36</sup> dar (s. Abb. 3).

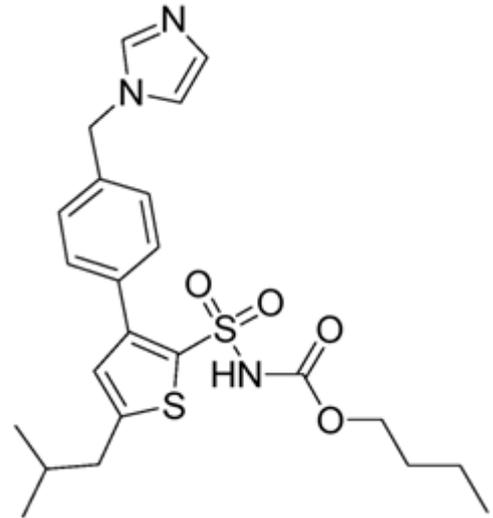


Abb. 3: Chemische Struktur von C21

### 1.3 Neuroprotektive Effekte der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation

Nach heutigem Wissensstand spielt der AT<sub>2</sub>-Rezeptor eine protektive Rolle im Rahmen unterschiedlichster Erkrankungen des Nervensystems. Die zugrundeliegende tierexperimentelle Evidenz stammt hierbei vor allem aus Modellen des ischämischen Hirninfarkts<sup>37-42</sup>, des neuronalen bzw. axonalen Traumas<sup>43-47</sup>, der Neurodegeneration<sup>48-50</sup> sowie der entzündlichen ZNS-Erkrankungen<sup>51</sup>.

In tierexperimentellen Studien des ischämischen Hirninfarkts wird die Okklusion der A. cerebri media zur Hirnischämie-Induktion<sup>37-42</sup> genutzt. Diese methodisch heterogene Gruppe beherbergt zum einen verschiedene Ansätze bezüglich der verwendeten Okklusionstechnik und des damit verbundenen Ischämie- bzw. Reperforationsintervalls. Zum anderen unterscheiden sich die Studien in der Wahl des AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten (CGP42112 oder C21), der Verabreichungsform sowie dem Zeitpunkt der Applikation in Bezug auf den Zeitpunkt der Induktion des Schlaganfalls. Trotz methodischer Unterschiede zeigen alle publizierten Studien, dass mit der intrazerebroventrikulären oder intraperitonealen Verabreichung eines AT<sub>2</sub>-Agonisten das Ausmaß des ischämischen Hirnschadens im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant abnimmt<sup>37-42</sup>. Dieser Effekt ist dabei unabhängig von der verwendeten Okklusionstechnik, vom verwendeten AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten oder von der Spezies. Von besonderer klinischer Relevanz ist der Fakt, dass eine erfolgreiche pharmakologische Intervention nicht nur präventiv<sup>37,39,41,42</sup>, sondern bis zu sechs Stunden post-okklusiv<sup>37,38,40-42</sup> erfolgen konnte. Mit der Verkleinerung des Infarktareals war zudem eine signifikante<sup>37-42</sup> oder zumindest tendenzielle Reduktion<sup>41</sup> des motorischen Defizits verbunden. McCarthy et al. zeigen zudem eine signifikante Senkung der Apoptoserate von Neuronen im und um das Infarktareal unter AT<sub>2</sub>-Agonisten-Therapie<sup>40</sup>. Mechanistisch scheinen die Aktivierung von protektiven Mikrogliazellen<sup>40,41</sup>, eine Senkung der bei Infarkt vermehrt gebildeten reaktiven Sauerstoffverbindungen<sup>37,39</sup> sowie die Reduktion pro-entzündlicher Zytokine<sup>42</sup> wie MCP-1 und TNF- $\alpha$  beteiligt zu sein. Zu den Ergebnissen unter Nutzung von AT<sub>2</sub>-

Rezeptor-Agonisten passt auch, dass AT<sub>2</sub>-Rezeptor-defiziente C57BL/6J-Mäuse nach Okklusion der A. cerebri media signifikant größere Ischämie-Areale als Wildtyp-Mäuse entwickeln<sup>42,52</sup>.

Gallinat et al. publizierten eine der ersten Studien, die eine Beteiligung des AT<sub>2</sub>-Rezeptors an Regenerationsprozessen traumatischer Nervenschädigungen nahelegten. Sie beschrieben, dass sowohl eine traumatische Nerventranssektion als auch eine -kompression zur transienten Steigerung der Expression des AT<sub>2</sub>-Rezeptors an der proximalen und distalen Läsionsstelle führt<sup>53</sup>. Im Fall der Nervenkompression verlief die Expressionssteigerung zudem parallel mit der voranschreitenden axonalen Regeneration<sup>53</sup>. Diese erste, noch rein deskriptive Studie war Anlass für eine Serie weiterer Arbeiten, in denen ein möglicher, therapeutischer Effekt einer AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation untersucht wurde. In Modellen der Kompression des N. opticus und des N. ischiadicus konnte in der Tat eine AT<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelte Steigerung der axonalen Regeneration nachgewiesen werden<sup>43,45</sup>, die auch funktionell mit einer signifikanten Verbesserung der motorischen und sensomotorischen Funktion verbunden war<sup>45</sup>. In einem weiteren Schritt zeigte unsere Arbeitsgruppe des Center for Cardiovascular Research in Berlin erstmalig in einem Modell der thorakalen Rückenmarkskompression, dass direkte AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation zu einer signifikant besseren neuromotorischen Funktionsfähigkeit führt<sup>44</sup>. Retrograde Färbung des kortikospinalen Traktes offenbarte eine signifikant größere Anzahl markierter Axone kaudal der Läsionsstelle in der AT<sub>2</sub>-Stimulations-Gruppe im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe, wobei die erhöhte Anzahl markierter Axone vermutlich entweder auf eine Zunahme regenerierender Axone oder eine vermehrte Kollateralisierung unverletzter Axone zurückführen war. In diesem Sinne konnten Umschweif und Kollegen in Sabra-Mäusen zeigen, dass direkte AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation nach stumpfem Schädeltrauma mit Verletzung der linken Hirnhemisphäre das Läsionsvolumen sowie das kognitive und motorische Defizit signifikant verkleinert<sup>46</sup>. Die Autoren beider Studien schlagen vor, dass AT<sub>2</sub>-Rezeptor-abhängige Neurotrophin-Stimulation über BDNF und NGF mit gesteigerter Akt- und ERK1/2-Phosphorylierung für einen Teil der beobachteten Effekte verantwortlich sind.

Hinsichtlich der Wirkung des AT<sub>2</sub>-Rezeptors auf Gedächtnis und Kognition ist zunächst zu bemerken, dass AT<sub>2</sub>-Rezeptor-defiziente Mäuse Einschränkungen des räumlichen Gedächtnisses und morphologische Unterschiede der Dendritenarchitektur des Hippocampus aufweisen<sup>48</sup>. Jing et al. zeigen, dass C21-behandelte Mäuse bezüglich räumlicher Lernvorgänge (getestet im Morris Water Maze Test) Vehikel-behandelten Tieren überlegen waren. Die Autoren assoziieren ihre Beobachtungen mit Elongation von Dendriten und Axonen hippocampaler Neurone<sup>49</sup>. Unklar ist, wie die i.p. Administration von C21 bei intakter Blut-Hirn-Schranke auf das ZNS wirken und, wie von den Autoren angemerkt, ein parallel durchgeführtes i.c.v. Administrationsprotokoll keine vergleichbaren Effekte erzielen konnte. In einem weiteren Experiment injizierten die Autoren Amyloid  $\beta$  (1-40) in das zerebrale Ventrikelsystem von Mäusen. Der im Rahmen dieses Alzheimer-Modells auftretenden kognitiven Beeinträchtigung konnte mittels AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation erfolgreich entgegenwirkt werden<sup>49</sup>. Eine weitere Studie nutzte ein Modell der bilateralen A. carotis communis-Verengung um hypoperfusionsbedingte, kognitive Einschränkungen zu erzeugen. Innerhalb dieses Modells profitierten auf diese Weise voroperierte Tiere von einer AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation hinsichtlich der Verbesserung der räumlichen

Gedächtnisleistung, während Tiere mit uneingeschränkter Karotisperfusion diesbezüglich bei AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation signifikant schlechter abschnitten<sup>50</sup>.

Schließlich beschreibt die 2015 veröffentlichte Arbeit von Valero-Esquitino et al. aus unserer Arbeitsgruppe eine therapeutische Wirksamkeit der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation bei der MOG-induzierten experimentellen Autoimmunenenzephalitis (EAE), einem Multiple Sklerose-Modell der Maus<sup>51</sup>. Ein prophylaktisches Therapieregime mit C21 führte zu einer signifikanten Reduzierung der Demyelinisierungsareale und assoziierten T-Zell-Infiltration sowie der Anzahl ruhender und aktivierter Mikrogliazellen im Rückenmark. Diese Effekte waren mit einem signifikant geringeren motorischen Defizit am Ende des Behandlungszeitraums von 30 Tagen verbunden. Ergänzende Zellkultur-Untersuchungen in LPS/IFN $\gamma$ -behandelten Hirnzellaggregaten der Ratte konnten zeigen, dass AT<sub>2</sub>-R-Stimulation sowohl vor Demyelinisierung schützte als auch die Remyelinisierung förderte.

Die auf eine neuroprotektive Rolle des AT<sub>2</sub>-Rezeptors deutende, tierexperimentelle Evidenz wird durch Studien auf molekularbiologischer Ebene ergänzt. Die auf diese Weise identifizierten, der Neuroprotektion zugrundeliegenden Mechanismen scheinen multifaktoriell zu sein und werden im Folgenden genauer beschrieben.

Die systemische Gabe von AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten ist mit keinem unmittelbaren, systemisch blutdrucksenkenden Effekt verbunden<sup>54</sup>. Die gefäßerweiternde Wirkung des AT<sub>2</sub>-Rezeptors wurde jedoch vielfach in vitro und in vivo beschrieben: Sie beruht auf der Aktivierung der NO/cGMP-Signalkaskade mit konsekutiver Relaxation der glatten Muskelzellen der Gefäß-Media durch Blockierung des Querbrückenzyklus<sup>55</sup>. Dies gilt u. a. auch für zerebrale Gefäße<sup>56</sup>. Einer möglichen regulatorischen Rolle innerhalb der zerebralen Perfusion entsprechend zeigen AT<sub>2</sub>-Rezeptor-defiziente Mäuse eine reduzierte Durchblutung der Penumbra im Mediainfarkt-Modell<sup>52</sup>. Protektive Effekte im Rahmen tierexperimenteller Hirninfarkt-Modelle können jedoch nur zum Teil mit einer Steigerung der zerebralen Perfusion assoziiert werden<sup>38,42</sup>. Die Anwesenheit jener günstigen Effekte bei fehlender Beeinflussung des zerebralen Blutflusses<sup>37</sup> deutet letztlich auf weitere zu Grunde liegende Mechanismen der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelten Neuroprotektion.

In diesem Zusammenhang sind die anti-oxidativen und anti-entzündlichen Eigenschaften des AT<sub>2</sub>-Rezeptors zu nennen: Ischämische Infarzierung von Hirngewebe ist mit einer Steigerung des oxidativen Stresses assoziiert, welcher über Induktion von Apoptose und Nekrose zum neuronalen Zelltod beiträgt<sup>57</sup>. Die Vermittlung dieser Effekte geht zum einen von in den ischämischen Zellen vermehrt anfallenden Reaktiven Sauerstoffspezies aus, z. B. durch NADPH-Oxidase gebildete Superoxid-Anionen<sup>57</sup>. Des Weiteren führt die entzündliche Antwort auf die Hirnischämie selbst zur gesteigerten Bildung von schädlichen Radikalen durch rekrutierte Leukozyten und Mikroglia über induzierbares Stickstoffmonoxid (iNOS)<sup>57</sup>. AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation vermindert den Anstieg der iNOS-<sup>37</sup> und Superoxid-Anionen-Expression<sup>39,42</sup> im Rahmen eines ischämischen Hirninfarkts. Diese Ergebnisse werden unterstützt von der Beobachtung, dass in AT<sub>2</sub>-Rezeptor-defizienten Mäusen nach zerebraler Ischämie die NADPH-Oxidase-Aktivität und Produktion von Superoxid-Anionen gesteigert sind<sup>52</sup>. Dem Prinzip der Eindämmung einer ausufernden, entzündlichen Reaktion folgend, führt die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation zur Verminderung der Freisetzung inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder MCP-1 im ischämischen Hirngewebe

und verbessert die funktionelle Integrität der gestörten Blut-Hirn-Schranke<sup>42</sup>. Die Wirkung des AT<sub>2</sub>-Rezeptors auf Mikrogliazellen innerhalb von Prozessen neuronaler Schädigung erscheint bisweilen ambivalent: McCarthy et al. beobachteten eine Zunahme aktivierter Mikrogliazellen im ischämischen Hirngewebe von mit einem AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten behandelten Tieren, welche mit einer Zunahme des neuronalen Überlebens nach Hirninfarkt verbunden war<sup>41</sup>. Valero-Esquitino et al. zeigen hingegen eine reduzierte Anzahl aktivierter Mikrogliazellen im Rückenmark behandelter Mäuse des MOG-EAE-Modells<sup>51</sup>. Ob sich die neuroprotektiven Eigenschaften des AT<sub>2</sub>-Rezeptors letztlich durch eine stimulierende Wirkung auf „neurotrophische“, eine inhibitorische Wirkung auf „neurotoxische“ Mikrogliazellen oder beides erklären lassen<sup>41,51</sup>, werden weitere Studien zeigen müssen.

Schließlich wirkt die pharmakologische Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors auch direkt auf das Neuron: So beobachteten McCarthy et al. einen hemmenden Einfluss des AT<sub>2</sub>-Rezeptors auf die Aktivierung der Effektor-Caspase 3 im ischämischen Hirngewebe<sup>40</sup>. Effektor-Caspasen vermitteln u. a. die Auflösung der Kernhülle, sowie die Fragmentierung der DNA im Rahmen der Apoptose. Neben diesem direkten Eingriff in den intrinsischen Signalweg der Apoptose, unterstützt der Rezeptor das neuronale Überleben möglicherweise auch durch Induktion von Faktoren der DNA-Reparatur, wie Methyl-Methansulfonat<sup>40</sup>. Erkenntnisse aus primären und sekundären Zellkulturmodellen weisen auf eine AT<sub>2</sub>-Rezeptor-abhängige Modulation neuronaler Wachstumsvorgänge: AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation induziert die morphologische Differenzierung in Zelllinien neuronalen Ursprungs, wie NG108-15 und PC-12W<sup>58</sup>. Die Aktivierung des AT<sub>2</sub>-Rezeptors beeinflusst den neuronalen Zytoskelett-Stoffwechsel auf Ebene der Mikrotubuli und Neurofilamente: So zeigen PC12w-Zellen unter AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation eine Expressionssteigerung von polymerisiertem beta-Tubulin und Mikrotubuli-assoziiertem Protein 2 (MAP-2) bei gleichzeitiger Abnahme der Expression von MAP1B<sup>59</sup>. Diese Expressionsdynamik gleicht der von regenerierenden Nervenzellen<sup>45</sup>. In den letzten Jahren konnte ein Zusammenhang zwischen der regenerationsfördernden Wirkung des AT<sub>2</sub>-Rezeptors im Rahmen axonaler bzw. dendritischer Schädigung und der Wirkung von Neurotrophinen hergestellt werden<sup>44,46</sup>. AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation führte zur Expressionssteigerung von Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und Nerve Growth Factor (NGF)<sup>44,46</sup>: BDNF und NGF sind Wachstumsfaktoren, die selbst neuroprotektive und regenerative Eigenschaften aufweisen<sup>46</sup>. Unter Inhibition der Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC war in diesem Sinne ein vollständiger Verlust des regenerativen Potentials der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation zu beobachten.

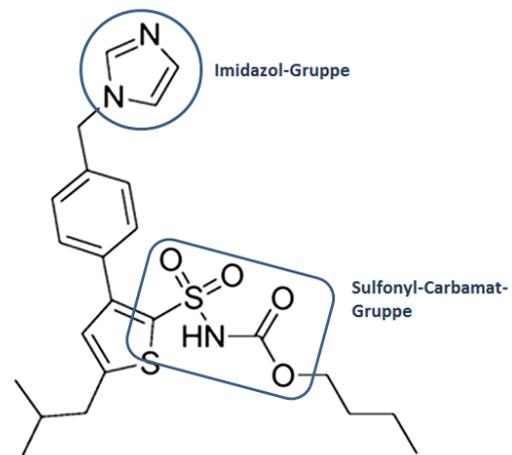
## **1.4 Entwicklung von AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten zur Behandlung von ZNS-Erkrankungen**

Wie im Vorhergehenden dargelegt, deutet Evidenz präklinischer Studien auf neuroprotektive Effekte der pharmakologischen Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors, die so auf ein mögliches therapeutisches Potential in der Behandlung neurologischer Erkrankungen des Menschen hinweisen.

Allerdings ist hinsichtlich der Pharmakokinetik der zur Verfügung stehenden AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten zu bemerken, dass sie nicht in der Lage sind, die intakte Blut-Hirn-Schranke zu überwinden<sup>60</sup>. Eine therapeutische Beeinflussung von Erkrankungen des ZNS mittels der zur

Verfügung stehenden Pharmazeutika ist bislang nur eingeschränkt möglich, z. B. über intrazerebroventrikuläre Verabreichung der Wirkstoffe oder im Rahmen einer pathophysiologischen Störung der Blut-Hirn-Schranke. Die Evaluierung des therapeutischen Potentials der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation innerhalb von Erkrankungen des ZNS wird so erschwert und eine klinische Entwicklung der vorhandenen AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten wie C21 erscheint unter dieser Voraussetzung zu riskant, insbesondere angesichts des hohen Risikos, dass sich neurotrophische Effekte im Tierversuch nicht auf Patienten übertragen lassen. Um die Erfolgsaussichten einer Entwicklung von AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten für die Behandlung neurologischer Erkrankungen bis zur klinischen Zulassung zu steigern, wäre es daher wünschenswert, AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten zu synthetisieren, die in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu permeieren.

Dabei ist die strukturelle Optimierung des etablierten AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten C21 ein möglicher methodischer Ansatz (s. Abb. 4). Ziel ist es, die Oberflächenpolarität des Moleküls durch Entfernung, Austausch oder Maskierung polarer funktioneller Gruppen zu reduzieren. Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke wird so erleichtert. Jener Prozess kann selektive Fluorierungen, die Entfernung von Heteroatomen aus dem Kohlenstoffgerüst oder die Maskierung der polaren Sulfonyl-Carbamat-Gruppe umfassen. Auch sind Modifikationen bzw. der Austausch der Imidazol-Gruppe zur Beeinflussung der ZNS-Gängigkeit geplant. Die abgewandelte Molekülstruktur sollte zudem eine Erkennung durch das P-Glykoprotein (P-GP) verhindern, da sonst das Erreichen und Aufrechterhalten einer therapeutischen Dosis des AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten im ZNS erschwert wird. P-GP ist eine Effluxpumpe, die im Endothel zerebraler Blutgefäße Xenobiotika, einschließlich C21, aus dem ZNS in das Blut-Kreislaufsystem eliminiert.



**Abb. 4:** Struktur von Compound 21 als Ausgangspunkt für AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten

Für die vorliegende Forschungsarbeit wurden die neuen, potentiellen AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten JS5090, L162-389 und VR0008, synthetisiert im Institut für Medizinische Chemie der Universität von Uppsala in Schweden, zur Verfügung gestellt. Hinsichtlich ihrer chemischen Struktur sind diese Substanzen auf die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke optimiert. Aufgrund der erfolgten Alterationen müssen die Substanzen auf ihre intrinsische Aktivität am Zielrezeptor überprüft werden. Bislang wurden neue Moleküle vor allem mittels Neurite-Outgrowth-Assay auf AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivität getestet<sup>61-64</sup>. Dabei werden undifferenzierte NG108-15-Zellen in Kultur über drei Tage mit dem potentiellen AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten behandelt. NG108-15-Zellen exprimieren keinen AT<sub>1</sub>-, sondern lediglich den AT<sub>2</sub>-Rezeptor und weisen eine runde Zellform auf. Bei erfolgter AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation kommt es zum im Phasenkontrastmikroskop nachweisbaren Axon- und Dendritenwachstum. Ein wesentlicher Nachteil des Neurite-Outgrowth-Assays sind die schlecht quantifizierbaren Ergebnisse und die subjektive Auswertung durch Zählen der Neuriten. Angesichts der Neusynthese von zahlreichen ZNS-gängigen, potentiellen

AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten ist der Bedarf eines sowohl quantifizierbaren als auch in der Durchführung einfachen und kostengünstigen Assays gestiegen.

## **1.5 Etablierung eines IL-6-Assay zur Bestimmung agonistischer Aktivität am AT<sub>2</sub>-Rezeptor**

Die Etablierung eines neuen In-vitro-Screening-Assays zum Nachweis von agonistischer Aktivität am AT<sub>2</sub>-Rezeptor ist Thema dieser Dissertationsarbeit. Es wurde auf Grundlage der Arbeit von Franziska Rompe aus unserer Arbeitsgruppe entwickelt<sup>22</sup>. Rompe et al. untersuchten die potentielle anti-inflammatorische Wirkung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation an primären Fibroblasten der Dermis von Mensch und Maus. Das zentrale Assay in diesen Versuchen beruhte auf einer AT<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelten Senkung der Expression von Interleukin-6-mRNA, die durch Präinkubation mit 10ng/ml TNF- $\alpha$  induziert worden war. Durch zusätzliche Inkubation mit dem AT<sub>2</sub>-Antagonisten PD123319 bzw. durch Versuche an dermalen Fibroblasten von AT<sub>2</sub>-Rezeptor-defizienten Mäusen kann mit diesem Assay auch untersucht werden, ob etwaige Effekte wirklich AT<sub>2</sub>-Rezeptor-abhängig sind<sup>22</sup>. Ein wichtiges Charakteristikum des IL-6-Assays ist, dass die anti-inflammatorischen Effekte unmissverständlich mit AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation und nicht mit AT<sub>1</sub>-Rezeptor assoziiert sind. Die antientzündlichen Effekte selbst sind dabei für das Assay nicht entscheidend – sie sind vielmehr Ausdruck einer agonistischen Aktivität des Pharmakons am AT<sub>2</sub>-Rezeptor.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, dass in primären Zellen erprobte Assay auf die monozytäre Zelllinie THP-1 zu übertragen. Die THP-1-Zelllinie zeigt bessere Verfügbarkeit und einfachere labortechnische Handhabung als primäre dermale Fibroblasten, die aus Tier- bzw. Spendergewebe isoliert und kultiviert werden müssen und nur bis Passage 5 bis 7 verwendet werden können. Zudem verfügte unsere Arbeitsgruppe bereits über Hinweise auf anti-inflammatorische Effekte einer AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation in THP-1-Zellen<sup>65</sup>. Tsuchiya et al. etablierten die THP-1-Zelllinie auf Basis von Monozyten, die aus dem Blut eines Patienten mit akuter, monozytärer Leukämie isoliert wurden. Sie hat sich innerhalb der Leukämie-bezogenen Forschung sowie zur Untersuchung der Rolle von Monozyten innerhalb der Immunabwehr etabliert<sup>66</sup>. Durch Inkubation mit dem Phorbol-Ester PMA werden die monozytären Zellen zu Makrophagen differenziert. THP-1-Makrophagen zeigen eine gesteigerte Expression von Komponenten des RAAS<sup>67</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des AT<sub>2</sub>-Rezeptors in THP-1-Zellen vor bzw. nach Differenzierung mit PMA mittels Western Blotting untersucht. Schließlich erfolgte das IL-6-Assay zur Evaluierung der neuen, potentiellen AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten JS5090, L162-389 und VR0008. Unter der Annahme, dass ein intrinsisch aktiver AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expressionssteigerung inhibiert<sup>65</sup>, wurden THP-1-Makrophagen auf unterschiedliche Gruppen verteilt und mit LPS behandelt. Diesen Gruppen wurde zeitgleich zur LPS-Stimulation ein „neuer“, potentieller AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist bzw. der etablierte AT<sub>2</sub>-R-Agonist C21 zugesetzt. Um die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Spezifität eventueller Effekte zu prüfen, wurde zusätzlich für jede Stimulationsgruppe eine weitere identische Stimulationsgruppe angelegt, in der die Zellen zusätzlich mit dem AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten PD123319 vorinkubiert wurden. Beobachtete anti-inflammatorische Effekte sollten so unter der Voraussetzung einer AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Abhängigkeit durch den AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten blockiert werden. Zum Vergleich

der Effekte diente eine LPS-Referenz-Gruppe ohne Zusatz eines AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Pharmakons. Die Quantifizierung der IL-6-mRNA erfolgte über quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR).

## 2 Materialien und Methodik

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, D
Akku-Pipettierhilfe Rota-Filler 3000TM	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
Descosept®	Dr. Schumacher, Malsfeld, D
Elektrophoresekammer H10 Mini, vertikal	Armin Baack – Bedarf und Technik für Labor und Medizin, Schwerin, D
Elektrophoresekammer, horizontal, div. Größen	Armin Baack – Bedarf und Technik für Labor und Medizin, Schwerin, D
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, D
Geldokumentationssystem	Syngene, Cambridge, GB
Inkubator HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlzentrifuge Mikro 22R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
Kreisschüttler KS 260 basic	IKA, Staufen, D
Kryo-Container Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Laborglas-Utensilien, diverse	Schott, Mainz, D
Laminar-Flow Arbeitsbank, Holten Safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lichtmikroskop Leica DM IL	Leica-Microsystems, Wetzlar, D
Mini-Zentrifuge	neo-Lab, Heidelberg, D
Mikroskop BZ-9000	Keyence, Ōsaka, J
Mikroliter-Pipetten-Systeme (Reference®, Research®)	Eppendorf, Hamburg, D
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	VWR-Life Science, Erlangen, D
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, D

Parafilm	American National Can Group, Chicago, USA
PCR-Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, D
pH- und Wasseranalyse-Messgerät PH211	Hanna Instruments, Kehl, D
Pipettenspitzen, diverse	VWR-Life Science, Erlangen, D
qPCR-System Mx 3000P™	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Spannungsgeber für Elektrophoreseapparatur Power Pac 300	Bio-Rad, Hercules, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Thermomixer Thermostat Plus	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge Hettich Mikro 20 2004	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
Vortex-2-Genie	Scientific Industries, Bohemia (New York), USA
Wasserbad WNB	Memmert, Schwabach, D
Western Blot-Utensilien	Bio-Rad, Hercules, USA
Zellkulturflaschen, diverse	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifugenröhrchen Falcon®, diverse	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
6-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, D
96 Well Multiply®-PCR-Platte Halbrand flach	Sarstedt, Nümbrecht, D

### 2.1.2 Chemikalien und Substanzen

Acrylamid-Bis (30%)	Serva, Heidelberg, D
Anti-AT <sub>2</sub> R Antikörper Ab92445 (Kaninchen, monoklonal)	Abcam Inc., Cambridge, GB
Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

---

Bovines Serum-Albumin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
Compound 21	Vicore Pharma, Göteborg, S
Desoxyribunukleotide: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Promega, Fitchburg, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eisessig	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol absolut (99,9%)	J. T. Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid Lösung (1%)	J. T. Baker, Deventer, NL
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt, D
Formamid, deionisiert (> 99,5%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerol	Serva, Heidelberg, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Lipopolysaccharide (E. coli)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, D
MLV-RT Puffer	Promega, Fitchburg, USA
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
PD123319	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polysorbat 20 (Tween®-20)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Power SYBR® Green Mastermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Random Primer	Promega, Fitchburg, USA
Reinstwasser	Biochrom AG, Berlin, D

Reverse Transkriptase MLV-RT	Promega, Fitchburg, USA
RNase-Zap	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
rRNasin, RNase Inhibitor	Promega, Fitchburg, USA
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, D
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe, D

### 2.1.3 Kits

ECLTM Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, GB
NucleoSpin® RNA II-Kit	Macherey-Nagel, Düren, D

### 2.1.4 Zellkulturmedien und -zusätze

Fetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
Gibco® RPMI 1640	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Biochrom AG, Berlin, D
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Pasching, A

#### Zellkulturmedien

(Volumenanteil in Prozent)

#### **Einfriermedium**

10%	DMSO
90%	FBS

---

**Vollmedium**

10%	FBS
89%	Gibco® RPMI 1640
1%	Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)

---

**Differenzierungsmedium**

10%	FBS
89%	Gibco® RPMI 1640
1%	Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)
	PMA (0,5 µmol/l)

---

**Hungermedium**

0,5%	FBS
98,5%	Gibco® RPMI 1640
1%	Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)

---

**2.1.5 Puffer und Lösungen**Gelelektrophorese-Puffer**10x TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer)**

242 g	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)
100 ml	0,5 M Na <sub>2</sub> -EDTA -Lösung (pH 8)
57,1 ml	Eisessig

---

Tris-Base in 500 ml Wasser lösen.

Na<sub>2</sub>-EDTA-Lösung (pH = 8) hinzufügen.

Eisessig hinzufügen.

Auffüllen der Lösung auf 1000 ml mit bidest. H<sub>2</sub>O.

**10x MOPS-Puffer (Morpholinopropansulfonsäure-Puffer)**

41,2 g	MOPS
10,9 g	Natriumacetat, 3-hydrat
3,7 g	EDTA, Natriumsalz

---

Zutaten in 800 ml DEPC-Wasser lösen.

Lösung mit Natriumhydroxid auf pH = 7 titrieren.

Auffüllen der Lösung auf 1000 ml mit bidest. H<sub>2</sub>O.

Western Blot-Puffer**RIPA- Puffer (Radio-Immunoprecipitation Assay-Puffer)**

Zusammensetzung nach Herstellerangaben (Sigma-Aldrich®)

**4x Probenpuffer**

303 mg	Tris-Base
800 mg	SDS
4 ml	Glycerol
2 ml	β-Mercaptoethanol
50 µl	Bromphenolblau

---

Lösung mittels Salzsäure auf pH = 6,8 einstellen.

Auffüllen der Lösung auf 10 ml mit bidest. H<sub>2</sub>O.

**1,5 M Trenngel-Puffer (pH 8,8)**

18,15g	Tris-Base
70ml	bidest. H <sub>2</sub> O

---

Tris-Base in bidest. H<sub>2</sub>O lösen.

Lösung mittels Salzsäure auf pH= 8,8 einstellen.

Auffüllen der Lösung auf 100ml mit bidest. H<sub>2</sub>O.

**0,5 M Sammelgel-Puffer (pH 6,8)**

6,05 g	Tris-Base
70 ml	bidest. H <sub>2</sub> O

---

Tris-Base in bidest. H<sub>2</sub>O lösen.

Lösung mittels Salzsäure auf pH = 6,8 einstellen.

Auffüllen der Lösung auf 100 ml mit bidest. H<sub>2</sub>O.

**1x Elektrophorese-Puffer**

3,13 g	Tris-Base
14,4 g	Glycin
10 ml	10% SDS

---

Zutaten der Lösung mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen.

**Towbin-Puffer (Blot-Puffer)**

3,13 g	Tris-Base
14,4 g	Glycin
5 ml	10% SDS
200 ml	Methanol

---

Zutaten der Lösung mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen.

**10x TBS-Lösung**

24,22 g	Tris-Base
87,6 g	Kochsalz
700 ml	bidest. H <sub>2</sub> O

---

Zutaten in bidest. H<sub>2</sub>O lösen.

Lösung mittels Salzsäure auf pH = 7,6 einstellen.

Auffüllen der Lösung auf 1000 ml mit bidest. H<sub>2</sub>O.

**TBS-T-Lösung**

100 ml	10x TBS-Lösung
900 ml	bidest. H <sub>2</sub> O
1 ml	Polysorbat 20

---

## 2.2 Methodik

### 2.2.1 Zellkultur der THP-1-Zellen

#### Kultivierung

Die Kultivierung der Monozyten erfolgte im Vollmedium im Inkubator bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>.

#### Stickstoff-Kryokonservierung

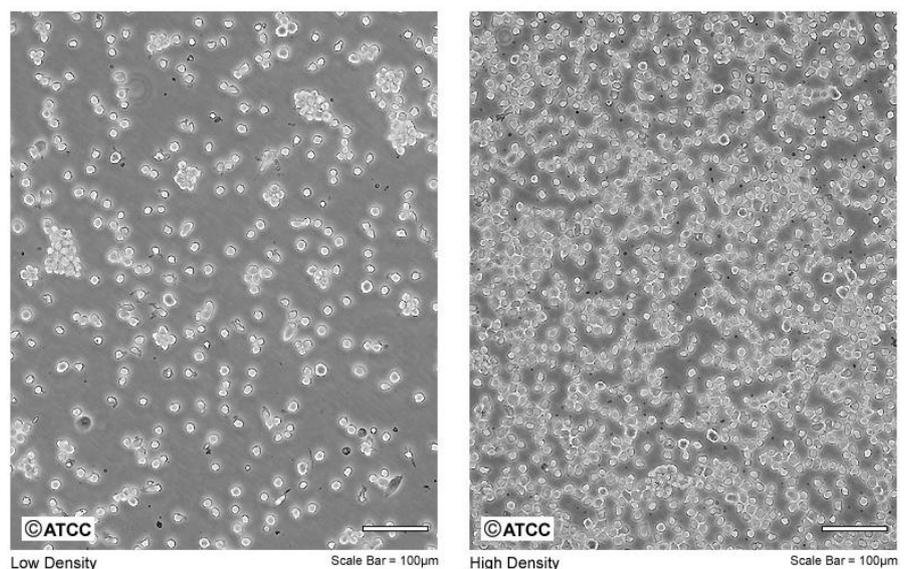
Zur Kryokonservierung der THP-1-Zellen erfolgte zunächst die Zentrifugation (1000 rpm für eine Minute) und anschließendes Absaugen des Nährmediums. Nach Spülung mit warmem, kalzium- und magnesiumfreiem FBS, wurden die Zellen erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Schließlich erfolgten die Suspension im Einfriermedium sowie die Verteilung von jeweils 1 ml der Suspension auf Kryotubes. Schonendes Abkühlen der Zellen um etwa 1 °C pro Stunde auf -80 °C im Eisfach wurde über einen Kryo-Container ermöglicht, in den die Kryotubes über 24 Stunden, umgeben von Isopropanol, eingebracht wurden. Eine Einbettung der Kryotubes in flüssigem Stickstoff war nun möglich.

#### Auftauen der Zellen

Direkt nach der Bergung aus flüssigem Stickstoff wurden die tiefgefrorenen Zellen in etwa 10 ml warmes Vollmedium eingebracht und konsekutiv bei 1000 rpm für etwa eine Minute abzentrifugiert. Nachdem der verbleibende Überstand abgesaugt war, konnten die Zellen in frischem Vollmedium resuspendiert und in Kulturflaschen ausgesät werden.

#### Passagierung und Splitting

In Zwei-Tages-Intervallen erfolgte die Erneuerung des Nährmediums. Dafür wurden die frei in Suspension befindlichen Zellen von der Kulturflasche in ein Falcon-Gefäß pipettiert und bei 1000 rpm für eine Minute abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes konnten die Zellen in frischem Medium resuspendiert und wieder in die Kulturflaschen überführt werden.

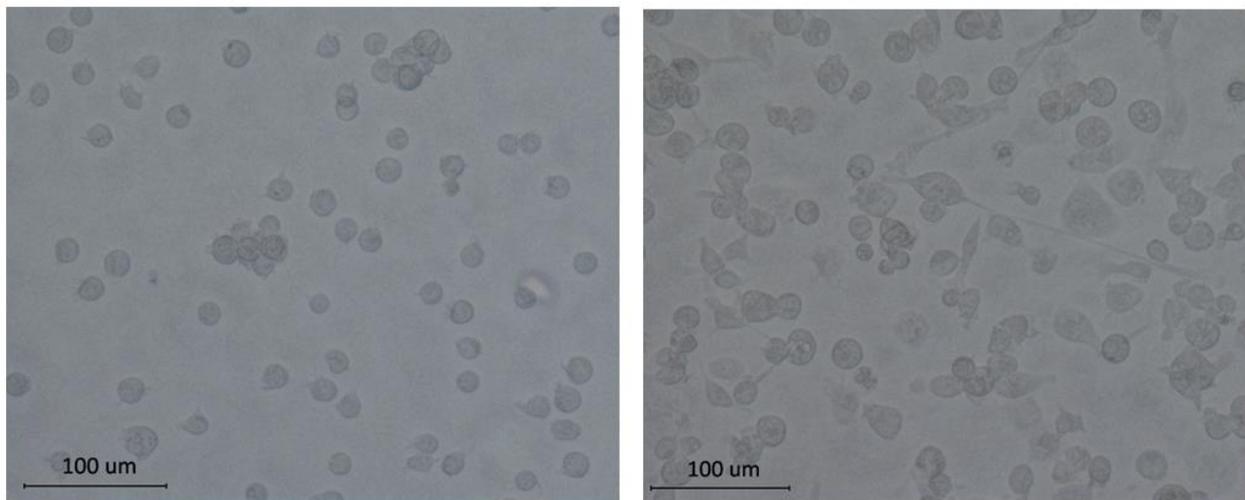


**Abb. 5:** Lichtmikroskopische Aufnahme der THP-1-Zellen in verschiedenen Zelldichten (entnommen aus <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/TIB-202.aspx#characteristics>)

Erreichten die Monozyten eine Zelldichte von ca. 80% (s. Abb. 5, rechts), so erfolgte das Zellsplitting: Die im Medium als Suspension vorliegenden THP-1-Zellen einer Zellkulturflasche wurden in Falcons pipettiert und abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Resuspension in frischem Medium. Um einen Verdünnungseffekt zu erzeugen, wurden die Zellen darauf auf mehrere Kulturflaschen gleichmäßig verteilt und mit zusätzlichem Medium angefüllt.

### Differenzierung der THP-1-Zellen

Zwei Tage vor Stimulation wurde die Differenzierung der THP-1-Monzyten zu Makrophagen durch Zugabe des Phorbol-Esters PMA, ins Medium induziert. Dazu erfolgte zunächst der Austausch des Vollmediums durch Differenzierungsmedium. Nach dreistündigem Inkubationsintervall wurde das PMA-Medium über Zentrifugation und Absaugen des Überstandes entfernt. Die Resuspension in Vollmedium erfolgte. Die Zellanzahl wurde nun durch Abzählung einer Probe in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Direkt im Anschluss erfolgte die Aussaat der THP-1-Zellen auf 6-Well-Platten mit  $1 \times 10^6$  Zellen/Well. Abschließend wurden die Zellen für 24 Stunden (ab Stimulationsbeginn) im Inkubator gelagert.



**Abb. 6 und Abb. 7:** Lichtmikroskopische Aufnahmen der THP-1-Zellen vor (links) und nach (rechts) Differenzierung mittels PMA

Innerhalb des 24-stündigen Stimulationsintervalls ist die Zelldifferenzierung morphologisch im Mikroskop nachvollziehbar (s. Abb. 6 und 7). Aus den rundlichen, frei in Suspension vorliegenden Monozyten entwickelten sich an der 6-Well-Oberfläche adhärente, durch Zellausläufer gekennzeichnete Makrophagen.

## **2.2.2 Stimulationsexperimente**

### Starving

Einen Tag vor Stimulation wurde das Vollmedium durch Hungermedium ersetzt: Dazu wurde der klare Überstand über dem Zellrasen der 6-Well bei vorsichtiger Neigung abgesogen und daraufhin frisches Hungermedium zu den Zellen pipettiert. Das Hungerintervall betrug 24 Stunden.

### Vorbereitung der Stimulationsgruppen

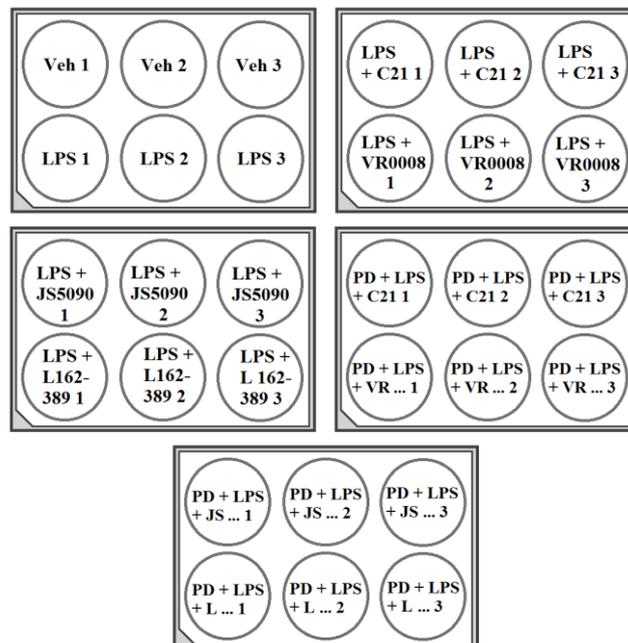
Zur Durchführung der Stimulation wurde nach Ablauf des Hungerintervalls das Hungermedium durch Stimulationsmedium ersetzt (Hungermedium mit den Pharmazeutika der jeweiligen Stimulationsgruppe). Tabelle 1 listet die vertretenen Stimulationsgruppen. Für die unterschiedlichen Stimulationsgruppen wurden separate, mit den entsprechenden Pharmazeutika versetzte Medium-Ansätze vorbereitet. Grundsätzlich wurden als Agonist wirkende Pharmazeutika in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M in die Stimulationslösung eingebracht. Tabelle 2 gibt Aufschluss über die verwendeten Substanzen, deren Lösung und Erreichen der gewünschten Konzentration für die Ansätze. Stimulationsgruppen mit antagonistisch wirksamen Substanzen wurden mit  $10^{-5}$  M der Antagonisten im Hungermedium eine halbe Stunde vor Applikation der Agonisten vorinkubiert. Die Stimulationsdauer des Experiments betrug sechs Stunden (optimiert für LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression nach Chanput et al.<sup>68</sup>). Für jede Stimulationsgruppe erfolgte die dreifache Ausführung in drei separaten Wells. Eine Plattenbelegung ist in Abb. 8 beispielhaft wiedergegeben.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der Stimulationsmedien

<b>Gruppe</b>	<b>Zusammensetzung des Stimulationsmediums</b>	<b>Verabreichung</b>
<b>Vehicle</b>	Kontrolle (Hungermedium)	Hier erfolgte der Wechsel auf das Stimulationsmedium mit den jeweils gelösten Substanzen direkt zum Stimulationszeitpunkt ohne Vorinkubation.
<b>LPS (E. coli)</b>	LPS (c = 50 ng/ml)	
<b>LPS + C21</b>	LPS (c = 50 ng/ml) + C21 (c = 1 µmol/l)	
<b>LPS + VR0008</b>	LPS (c = 50 ng/ml) + VR0008 (c = 1 µmol/l)	
<b>LPS + JS5090</b>	LPS (c = 50 ng/ml) + JS5090 (c = 1 µmol/l)	
<b>LPS + L162-389</b>	LPS (c = 50 ng/ml) + L162-389 (c = 1 µmol/l)	
<b>PD123319 + LPS + C21</b>	PD123319 (c = 10 µmol/l) + LPS (c = 50 ng/ml) + C21 (c = 1 µmol/l)	Es erfolgte die Vorinkubation der Zellen mit im Hungermedium gelöstem PD123319 (c = 10 µmol/l) für 30 Minuten. Mit Beginn der PD-Stimulation wurden die verbleibenden Substanzen, gelöst im Hungermedium, ergänzt.
<b>PD123319 + LPS + VR0008</b>	PD123319 (c = 10 µmol/l) + LPS (c = 50 ng/ml) + VR0008 (c = 1 µmol/l)	
<b>PD123319 + LPS + JS5090</b>	PD123319 (c = 10 µmol/l) + LPS (c = 50 ng/ml) + JS5090 (c = 1 µmol/l)	
<b>PD123319 + LPS + L162-389</b>	PD123319 (c = 10 µmol/l) + LPS (c = 50 ng/ml) + L162-389 (c = 1 µmol/l)	

**Tabelle 2:** Zubereitung der Stocklösungen

Substanz	Molekulare Masse (g/mol)	Lösungs-mittel	Konzentration der Stocklösung	Konzentration im Well (2 ml Medium/Well)	Pipetiertes Volumen aus Stock/Well
LPS (E. coli)	-	H <sub>2</sub> O bidest.	100 µg/ml	50 ng/ml	1 µl
C21	497	100% DMSO	1 mmol/l	1 µmol/l	2 µl
VR0008	617	100% DMSO	1 mmol/l	1 µmol/l	2 µl
JS5090	506	100% DMSO	1 mmol/l	1 µmol/l	2 µl
L162-389	562	100% DMSO	1 mmol/l	1 µmol/l	2 µl
PD123319	737	H <sub>2</sub> O bidest.	1 mmol/l	1 µmol/l	20 µl

**Abb. 8:** Beispielhafte Plattenbelegung der LPS-StimulationsexperimenteZellernte

Um eine zeitgerechte Zellernte zu ermöglichen, wurden die einzelnen Stimulationen der verschiedenen Stimulationsgruppen und gleichsam deren Ernte gestaffelt in 15 Minuten-Abständen durchgeführt. Zur Zellernte wurde das Stimulationsmedium aus den 6-Wellen abgesaugt. Direkte Applikation von 350 µl Puffer RA1 (aus dem NucleoSpin® RNA II-Kit) und

3,5 µl β-Mercaptoethanol auf den Zellrasen der Wells führte zur Lyse der Zellen sowie zur Ablösung von der Adhäsionsfläche. Abschließend konnten die in Eppendorf-Gefäße überführten Zelllysate bei -70 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden.

### 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

#### RNA-Isolation

Zur Isolierung von RNA aus den Zelllysaten wurde das NucleoSpin® RNA II-Kit (Macherey-Nagel, Düren, D) verwendet. Jenes Verfahren nutzt einen mehrschrittigen Filtrationsprozess, um die RNA aus den Zelllysaten zu isolieren (Tabelle 3 zeigt die eingesetzten Substanzen in der Übersicht).

Die Zelllysate wurden zunächst auf höchster Stufe im Vortexmischer durchmischt, um eine vollständige Lyse der Zellen sicherzustellen. Um die Proben anschließend von größeren Zellrückständen zu befreien, wurden die Zelllysate auf einen in ein Eppendorf-Gefäß eingebrachten Nucleo-Spin®-Filter pipettiert. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm für eine Minute wurde der Filter verworfen und das im Eppendorf-Gefäß befindliche Filtrat weiterverwendet. Ein Versetzen der Proben mit 350 µl Ethanol (70%) durch sorgsames Auf- und Abpipettieren homogenisierte das Filtrat und bereitete die RNA-Bindung vor. Zur RNA-Bindung an den Filter wurden die Proben nun jeweils auf eine in ein Eppendorf eingebrachte NucleoSpin®-RNA II-Säule geladen und 30 Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde das nun in den Eppendorf-Gefäßen befindliche Filtrat verworfen und die NucleoSpin®-RNA II-Säule weiterverwendet. In Vorbereitung auf den nun bevorstehenden DNA-Verdau wurde auf die in ein neues Eppendorf-Gefäß eingebrachte NucleoSpin®-RNA II-Säule (mit der gebundenen RNA) 350 µl MDB pipettiert. Im Anschluss erfolgte die erneute Zentrifugation der Proben bei 13.000 rpm für eine Minute, um die mit RNA-beladenen Membranen in den NucleoSpin®-RNA II-Säulen zu trocknen. Für den darauf anschließenden DNA-Verdau mittels rDNase wurde zunächst für jede Probe ein Reaktions-Puffer aus 10 µl rDNase und 90 µl rDNase-Puffer zubereitet. Daraufhin wurden 95 µl des Reaktions-Puffers auf die Mitte der in der NucleoSpin®-RNA II-Säule befindlichen Membran aufgebracht und 15 Minuten inkubiert. Die Aufreinigung der Säulenmembran wurde in drei Waschungschritten vollzogen: Zunächst wurden dafür jeweils 200 µl des RA2-Puffers auf die Membran pipettiert und die Proben bei 13.000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurde die NucleoSpin®-RNA II-Säule in neue Eppendorf-Gefäße gegeben. Nun erfolgte die Pipettierung von 600 µl des RA3-Puffers auf die Säulenmembran und erneute Zentrifugation (13.000 rpm für 30 Sekunden). Das Filtrat wurde verworfen und 250 µl des RA3-Puffers zum letzten Waschungschritt auf die Membran der Säule aufgebracht. Abschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben für zwei Minuten bei 13.000 rpm zur vollständigen Trocknung der Membran.

Schließlich konnte durch Auftragen von 40 µl RNase-freiem Wasser auf die Säulenmembran und Zentrifugation (13.000 rpm für eine Minute) die an der Membran gebundene RNA in wässrige Lösung überführt werden. Für jedes ursprünglich vorhandene Well mit Zelllysate wurde so ein RNA-Isolat in 40 µl Lösung erzeugt.

**Tabelle 3:** Substanzen des NucleoSpin® RNA II-Kits

Substanz	Zugesetztes Volumen/Probe
$\beta$ -Mercaptoethanol	3,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bidest. (RNase frei)	40 $\mu$ l
Ethanol, 70%	350 $\mu$ l
Membrane Desalting Buffer (MDB)	350 $\mu$ l
RA1-Puffer	350 $\mu$ l
RA2-Puffer	200 $\mu$ l
RA3-Puffer	600 $\mu$ l + 250 $\mu$ l
rDNase	10 $\mu$ l

### RNA-MOPS-Gelelektrophorese der Isolate

Zur Bestätigung einer erfolgreichen RNA-Isolierung wurde ein Volumenanteil jeder RNA-Probe mittels Elektrophorese aufgetrennt. Hierfür diente ein Gel auf Morpholinopropansulfonsäure-Basis, welches zusammen mit dem MOPS-Puffer die fragile RNA vor der Degradation bzw. dem Abbau schützen und optimale Laufeigenschaften im Gel gewährleisten sollte. Die Anfertigung eines MOPS-Gels ist eine Standardprozedur im Rahmen des Northern Blotting<sup>69</sup>.

Für die Anfertigung des Gels wurden 1,1 g Agarose in 11 ml 10x MOPS-Puffer und 80,3 ml RNase-freiem Wasser unter mehrfachem Aufkochen gelöst. Daraufhin wurden in die auf 50 °C abgekühlte Lösung 18,7 ml 37% Formaldehyd-Lösung eingerührt und anschließend auf einen RNase-freien Gelschlitten gegossen. Nach Einbringung der Gelkämme härtete die Agarose im Kühlraum (4 °C) aus. Zwischenzeitlich erfolgte die Denaturierung der RNA-Proben zur Auflösung der Sekundärstruktur. Dies sollte einen gleichmäßigen Lauf innerhalb des MOPS-Gels ermöglichen. Die Zubereitung des Mastermix kann der Tabelle 4 entnommen werden. Das Auftrennen der RNA im Mops-Gel wurde in 1x MOPS-Puffer bei 50 bis 60 V durchgeführt. Nach einer Laufzeit von etwa drei Stunden wurden die Gele fotografiert. Im digitalenAnhang sind die RNA-Gele aller RNA-Proben der einzelnen Experimente aufgeführt.

**Tabelle 4:** Vorbereitung der Proben für die MOPS-Gelelektrophorese

Substanz	Angesetztes Volumen/Probe
Formamid, deionisiert	12,5 µl
MOPS-Puffer (10x)	2,5 µl
Formaldehyd (37%)	4 µl
<u>Zubereitung</u>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mastermix ansetzen</li> <li>2. Zugabe von 19 µl Mastermix/Probe</li> <li>3. Zugabe von 0,1 µl Ethidiumbromid/Probe</li> <li>4. Inkubation bei 65 °C für 10 Minuten</li> <li>5. Zugabe von 2,5 µl Bromphenolblau in Glycerol/Probe</li> <li>6. Proben vortexen</li> <li>7. Beladen des Gels</li> </ol>	

### Konzentrationsbestimmung und Verdünnung der RNA-Isolate

Um den Gehalt an isolierter RNA in den Proben zu quantifizieren, erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration mittels NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer. Dafür wurden nach Referenzwertfestlegung mit 1,5 µl H<sub>2</sub>O bidest. für jede Probe 1,5 µl des RNA-Isolats auf den Probensteller pipettiert und die Extinktion bei 260 nm gemessen. Zwischen den Messgängen wurde der Probensteller durch ein Papiertuch gereinigt. Aromatische Ringstrukturen der organischen Basen der RNA-Nukleotidketten absorbieren Licht mit 260 nm Wellenlänge. So kann über das Ausmaß der Extinktion bei 260 nm indirekt die RNA-Konzentration bestimmt werden.

### Synthese der cDNA

In Vorbereitung auf die Durchführung der quantitativen RT-PCR wurde die RNA der Isolat-Proben über eine Reverse Transkriptase in cDNA überführt. Dazu wurden aus jeder Probe Volumina entsprechend einer RNA-Masse von 2 µg in neue Eppendorf-Gefäße pipettiert und mit H<sub>2</sub>O auf 11,375 µl Volumen ergänzt. Daraufhin erfolgte zunächst der Zusatz von 2 µl einer Random Primer-Stocklösung der Konzentration 0,5 µg/µl, insgesamt also 1 µg Random Primer pro Probe. Anschließend wurden die mit den Primern versetzten Proben für 5 Minuten auf 70 °C im Thermomixer erhitzt (Annealing; Spaltung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge) und darauf sofort auf Eis abgekühlt (verhindert Reassoziierung der Einzelstränge). Nun wurde ein Mastermix für die RT-PCR-Reaktion angelegt, die Substanzen können der Tabelle 5 entnommen werden. Pro Probe wurden 11,625 µl Mastermix zugesetzt.

**Tabelle 5:** Zusammensetzung des RT-PCR-Mastermix

Zugesetztes Volumen/Probe	Substanz
5 µl	5-MLV-Puffer
1,25 µl je dNTP	dNTPs
	dATP
	dCTP
	dGTP
	dTTP
1 µl	MLV-RT
0,625 µl	rRNasin

In den Proben befand sich damit ein Gesamtvolumen von 25 µl. Abschließend erfolgte die

Inkubation der Proben bei 37 °C für 60 Minuten zur reversen Transkription der in den Proben enthaltenen RNA zu cDNA.

In Vorbereitung auf die Weiterverwendung der cDNA-Proben für die qPCR wurden die in einer Konzentration von 80 ng/µl vorliegenden cDNA-Probenlösungen im Verhältnis von 1:40 verdünnt. Die vollständig in cDNA umgeschriebenen, auf eine Konzentration von 2 ng/µl verdünnten Proben wurden daraufhin entweder direkt weiterverwendet oder bis zur Weiterverwendung bei -20 °C im Tiefkühlfach gelagert. Zur Kontrolle eventueller Verunreinigungen der Ausgangsproben (RNA-Isolate) wurde RNA anteilig aus mehreren Proben in RT-negative Kontrollproben zusammengeführt. Hier erfolgte die Vorbereitung des Ansatzes zur cDNA-Synthese unter Zugabe von 1 µl Wasser pro Probe, anstatt des Zusatzes von 1 µl MLV-RT pro Probe. Die RT-negativen Proben stellten demnach die Negativkontrolle der cDNA-Synthese dar.

Die erfolgreiche Umschreibung der RNA- zu cDNA-Proben wurde durch Auftrennung mittels DNA-Gelelektrophorese bestätigt.

#### DNA-Gelelektrophorese der cDNA-Transkripte

Zur Überprüfung der cDNA-Synthese wurden Stichproben der Transkripte innerhalb eines Gels auf TRIS-Acetat-EDTA-Puffer-Basis elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Anfertigung des Gels wurden 150 ml des TRIS-Acetat-EDTA-Puffers mit 2,25 g Agarose vermischt und unter mehrfachem Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach einiger Abkühlung wurden 7,5 µl Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel in den Gelschlitzen gegossen. Nach 30 Minuten zur Aushärtung wurde das Gel beladen. Das Auftrennen der cDNA im TAE-Gel wurde in 1x TAE-Puffer bei 80 V umgesetzt. Nach einer Laufzeit von etwa 40 Minuten wurden die Gele fotografiert. Im digitalen Anhang sind die DNA-Gele aller cDNA-Proben der einzelnen Experimente aufgeführt.

#### Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-PCR ist ein Verfahren, das auf Basis einer klassischen Polymerasekettenreaktion quantitative Vergleiche zwischen der in den einzelnen Proben enthaltenen DNA möglich macht. Zudem kann die Zunahme der PCR-Produkte mit jedem Reaktionszyklus bereits während der Messung beobachtet werden. Innerhalb des Verfahrens der Polymerasekettenreaktion, welches dem zellphysiologischen Vorgang der DNA-Replikation nachempfunden ist, wird ein durch Primer abgegrenztes Segment (Amplikon) auf einem DNA-Einzelstrang durch Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase in mehreren Durchläufen amplifiziert. Dieser mehrphasige Vorgang beginnt mit der Aktivierung DNA-Polymerase bei 95 °C. In der anschließenden Denaturierungsphase wird die in Doppelsträngen vorliegende DNA der Proben thermisch (95 °C) in Einzelstränge getrennt. Nun kann über die Einstellung einer Primer-spezifischen Hybridisierungs-Temperatur (im Fall der vorliegenden Arbeit 60 °C) die Bindung der Primer an den DNA-Einzelstrang (Annealing) ermöglicht werden. In der darauf anschließenden Elongationsphase (enzym-spezifische Temperatur, hier 72 °C) synthetisiert die Taq-Polymerase das von den Primern umgrenzte DNA-Segment durch Polymerisierung einzelner 2-Desoxyribonukleotide aus 2-Desoxyribonukleosidtriphosphaten nach. Das zyklische

Durchlaufen der Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Elongationsphase führt so zur Synthese zahlreicher Amplifikate des gewählten DNA-Segments.

Das Prinzip der in dieser Arbeit verwendeten qPCR zeichnet sich durch den Einsatz eines mit dem DNA-Doppelstrang interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes aus. Am Ende einer jeden Elongationsphase erfolgt die Messung der Fluoreszenzintensität, die mit dem Anstieg der Amplifikat-Menge zunimmt. Jener Anstieg lässt sich über seine Kinetik in verschiedene, aufeinanderfolgende Phasen unterteilen (s. Abb. 9). Während der lag-Phase ist das Aufeinandertreffen der einzelnen Ausgangsstoffe zur Reaktion noch relativ unwahrscheinlich. Mit Zunahme der Amplifikat-Menge jedoch steigt die Reaktionshäufigkeit bis zu einem exponentiellen Anstieg (log-Phase). Bei Übergang in die exponentielle Phase wird das Fluoreszenzsignal messbar und mit dem verbundenen Zyklus als Schwellenwert-Zyklus oder CT-Wert erfasst. Mit steigender Zykluszahl nehmen die Reaktionsprodukte der PCR zu und behindern den Reaktionsablauf, zumal die beteiligten Substrate allmählich verbraucht bzw. durch das mehrfache Erhitzen zerstört werden (Plateau-Phase). Über den Vergleich der CT-Schwellenwerte verschiedener Proben können so Rückschlüsse auf die anfangs in der Probe enthaltene Menge des DNA-Segments gezogen werden. Je früher der CT-Wert dabei erfasst werden kann, desto höher fällt die cDNA-Konzentration der Probe aus. Zur Überprüfung bzw. Unterscheidung der entstandenen Amplifikate bzw. zum Nachweis von möglicherweise gebildeten Primerdimeren wird im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt: Eine kontinuierliche Erhöhung der Temperatur führt bei einer für das Amplifikat spezifischen Temperaturgrenze zur Auftrennung des DNA-Doppelstranges und Freisetzung des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes. Die damit verbundene Abnahme des Fluoreszenzsignals kann erfasst werden. Über diese Methode können verschiedene PCR-Produkte, aber auch Primerdimere, die einen im Vergleich niedrigeren Schmelzpunkt besitzen, unterschieden werden.

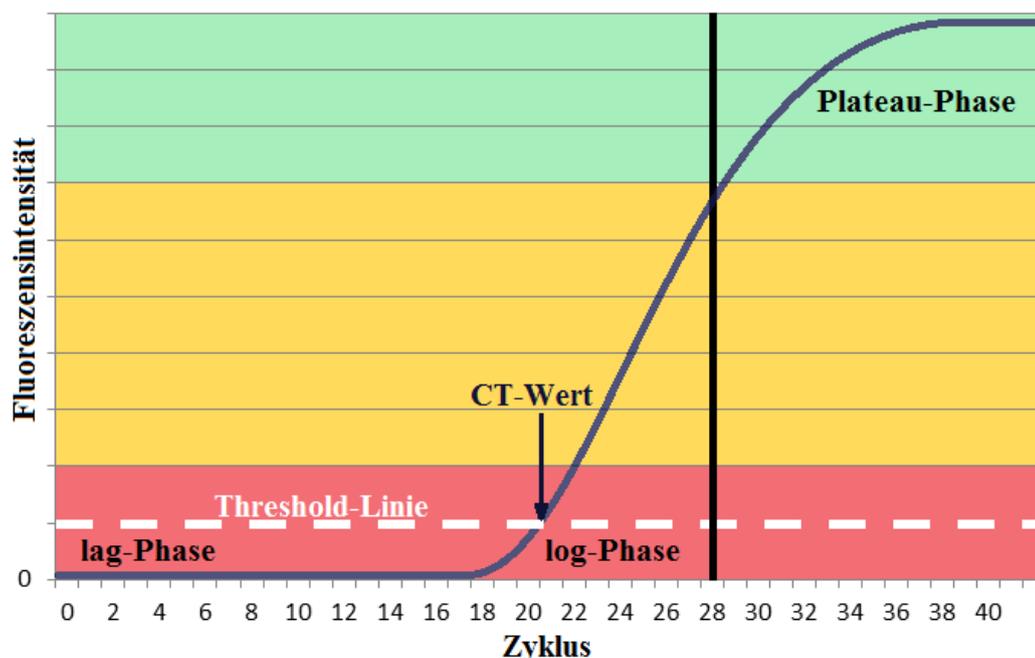


Abb. 9: Kinetik der qPCR

Zur Durchführung der qPCR wurde zunächst eine 96-Well-Platte mit den cDNA-Proben beladen: Bei einer Konzentration von 2 ng/μl cDNA in jeder Probe wurden genau 10 μl pro Well, d. h. 20 ng cDNA pipettiert. Für jede Probengruppe wurden Triplets pipettiert. Der nächste Arbeitsschritt beinhaltete die Zugabe von 15 μl eines vorbereiteten q-PCR-Mastermix zu jedem mit cDNA beladenem Well. Die exakte Zusammensetzung des qPCR-Mastermix ist in Tabelle 6 wiedergegeben. Bei dem Hauptbestandteil des qPCR-Mastermix handelte es sich um den Power SYBR® Green PCR Mastermix. Die für die Analyse verwendeten Primer sind in Tabelle 7 dargestellt. Ubiquitin C diente in dieser Untersuchung als *housekeeping gene* zur Bestimmung des basalen Expressionsniveaus der in den Stimulationsexperimenten untersuchten Zellen. Als etablierter Marker für inflammatorische Vorgänge wurde IL-6 genutzt, um das Entzündungsausmaß quantitativ zu erfassen. So wurde, innerhalb jeder 96-Well-Platte, für jede Probe ein Ubiquitin C-Ansatz sowie ein IL-6-Ansatz pipettiert. Eine beispielhafte Plattenbelegung ist in Abb. 10 aufgezeigt. Auf den Verschluss mit klebender optischer Folie folgend, konnte die 96-Well-Platte bei 1000 rpm und einer Temperatur von etwa 4 °C kurz abzentrifugiert werden. Das Herzstück der Methode, die eigentliche Polymerasekettenreaktion, lief in einer PCR-Maschine des Typs Mx 3000P™ ab, wobei die Messungserfassung sowie die Auswertung der Reaktion durch die dazugehörige Mx Pro QRPCR Software erfolgte. Nach Beladen der Maschine mit der zu untersuchenden 96-Well-Platte wurde ein für die Primer spezifisches Temperaturprofil durchlaufen, welches in Tabelle 8 in Kürze wiedergegeben ist. Es erfolgte zunächst die Aktivierung der DNA-Polymerase bei 95 °C für zehn Minuten. Im Anschluss erfolgten, jeweils für 30 Sekunden bei 95 °C, 60 °C bzw. 72 °C, die Denaturierung (Melting), Primerhybridisierung (Annealing) und Elongation (Amplifikation) der Proben. Nach erstmaligem Durchlaufen der drei Phasen wurden diese wiederholt, insgesamt in 40 Zyklen. Im Anschluss an die PCR wurde die Schmelzkurve erstellt. Zu diesem Zweck erfolgte die Abkühlung der Probe auf 55 °C für 30 Sekunden sowie die anschließende schrittweise Erhitzung auf 95 °C für 30 Sekunden.

**Tabelle 6:** Zusammensetzung des qPCR-Mastermix

Substanzen	pro 15 μl
ABI Mix	12,5 μl
Primer (forward)	0,6 μl
Primer (reverse)	0,6 μl
Bidest. H <sub>2</sub> O	1,3 μl

**Tabelle 7:** Primerverzeichnis

Gen	Primer-Sequenz (5' ⇒ 3')	Annealing-Temperatur
Homo sapiens interleukin 6	forward primer: CCACTCACCTCTTCAGAACGAATT  reverse primer: AGTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC	60 °C
Homo sapiens ubiquitin c	forward primer: ATTTGGGTTCGCAGTTCTTG  reverse primer: TGCCTTGACATTCTCGATGG	60 °C

**Tabelle 8:** Reaktionsschritte der qPCR

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Zykluszahl
Aktivierung der Taq-Polymerase	10 Minuten	95 °C	1
Denaturierung	30 Sekunden	95 °C	40
Primerhybridisierung	30 Sekunden	60 °C	
Elongation	30 Sekunden	72 °C	
Erstellen der Dissoziationskurve	30 Sekunden	55 °C	1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
<b>A</b>	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 2	LPS 2	LPS 2	LPS 3	LPS 3	LPS 3	LPS+ C21 1	LPS+ C21 1	LPS+ C21 1	Ubiquitin c	
<b>B</b>	LPS+ C21 2	LPS+ C21 2	LPS+ C21 2	LPS+ C21 3	LPS+ C21 3	LPS+ C21 3	JS 1	JS 1	JS 1	LPS+ JS 2	LPS+ JS 2	LPS+ JS 2		
<b>C</b>	LPS+ JS 3	LPS+ JS 3	LPS+ JS 3	LPS+ C21+ PD 1	LPS+ C21+ PD 1	LPS+ C21+ PD 1	LPS+ C21+ PD 2	LPS+ C21+ PD 2	LPS+ C21+ PD 2	LPS+ C21+ PD 3	LPS+ C21+ PD 3	LPS+ C21+ PD 3		
<b>D</b>	LPS+ JS+ PD 1	LPS+ JS+ PD 1	LPS+ JS+ PD 1	LPS+ JS+ PD 2	LPS+ JS+ PD 2	LPS+ JS+ PD 2	LPS+ JS+ PD 3	LPS+ JS+ PD 3	LPS+ JS+ PD 3	RT-	RT-	H <sub>2</sub> O		
<b>E</b>	LPS 1	LPS 1	LPS 1	LPS 2	LPS 2	LPS 2	LPS 3	LPS 3	LPS 3	LPS+ C21 1	LPS+ C21 1	LPS+ C21 1		Interleukin-6
<b>F</b>	LPS+ C21 2	LPS+ C21 2	LPS+ C21 2	LPS+ C21 3	LPS+ C21 3	LPS+ C21 3	JS 1	JS 1	JS 1	LPS+ JS 2	LPS+ JS 2	LPS+ JS 2		
<b>G</b>	LPS+ JS 3	LPS+ JS 3	LPS+ JS 3	LPS+ C21+ PD 1	LPS+ C21+ PD 1	LPS+ C21+ PD 1	LPS+ C21+ PD 2	LPS+ C21+ PD 2	LPS+ C21+ PD 2	LPS+ C21+ PD 3	LPS+ C21+ PD 3	LPS+ C21+ PD 3		
<b>H</b>	LPS+ JS+ PD 1	LPS+ JS+ PD 1	LPS+ JS+ PD 1	LPS+ JS+ PD 2	LPS+ JS+ PD 2	LPS+ JS+ PD 2	LPS+ JS+ PD 3	LPS+ JS+ PD 3	LPS+ JS+ PD 3	RT-	RT-	H <sub>2</sub> O		

**Abb. 10:** Beispielhafte Plattenbelegung der qPCR

## 2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

In Vorbereitung auf die Western Blot-Analyse wurde ein weiteres Stimulationsexperiment durchgeführt. Innerhalb dessen wurden die Monozyten nach PMA-Differenzierung in verschiedenen Stimulationsmedien inkubiert (Protokoll mit dem unter Kapitel 2.2.2 identisch). Die Western Blot-Stimulationsgruppen können Tabelle 9 entnommen werden. Eine Besonderheit innerhalb der Western Blot-Experimente bestand darin, dass zusätzlich eine Kontrollgruppe von undifferenzierten Monozyten untersucht wurde.

**Tabelle 9:** Stimulationsgruppen der Western Blot-Experimente

Stimulationsgruppe	Zusammensetzung Stimulationsmedium
THP-1 undifferenziert	Kontrolle (Hungermedium)
THP-1 differenziert	Kontrolle (Hungermedium)
LPS (THP-1 diff.)	LPS (c = 50 ng/ml)
C21 (THP-1 diff.)	C21 (c = 1 µmol/l)

### Proteinextraktion und -quantifizierung

Nach Durchführung der für die Western Blot-Analyse bestimmten Stimulationsexperimente und Verstreichen der Inkubationszeit von sechs Stunden wurde das Stimulationsmedium aus den 6-Well-Platten abgesaugt. Es erfolgte ein Waschvorgang der adhärenen Monozyten mit PBS und die anschließende Zugabe von 200 µl des RIPA-Puffers zur Zellyse. Nach Transfer des Lysats in Eppendorf-Gefäße wurden die Proben im Kühlraum auf einem Dreh-Rad für 30 Minuten gemischt. Ein Abzentrifugieren der in den Proben befindlichen Zellrückstände erfolgte bei 14.000 rpm für zehn Minuten. Der Protein-haltige Überstand wurde daraufhin in neue Eppendorf-Gefäße überführt und diese bei -20 °C gelagert.

Zur Quantifizierung des Proteinanteils der Proben wurde ein Kit auf Basis des BCA-Protein Assay genutzt (Bicinchoninsäure-haltig). Die in den Proben enthaltenen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen werden dabei unter basischen Bedingungen durch Probenproteine zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert. Der Zusatz von Bicinchoninsäuren führt zur Bildung von  $\text{BCA}/\text{Cu}^{1+}$ -Komplexen, die ein Absorptionsmaximum bei 562 nm aufweisen. Die Bildung dieser Komplexe steigt mit Zunahme des Proteingehalts der Probe. Unter Zuhilfenahme einer BSA-Verdünnungsreihe wurde eine Standardkurve für Proteinkonzentration und gemessene Absorption erstellt. Über die Standardkurve konnten so den ermittelten Absorptionswerten der einzelnen Proben Proteinkonzentrationen zugeordnet werden.

### Western Blotting

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteinproben wurden zunächst die SDS-Polyacrylamid-Gele angefertigt. Für das Trenngel wurde der entsprechende Ansatz (s. Tab. 10) in eine Gelform gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Zur Polymerisierung und Aushärtung des Gels, wurde der Ansatz für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Nach Polymerisation erfolgten das Abgießen des Isopropanols, die Spülung des Trenngels mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$ , sowie die Anfertigung des Sammelgels durch Gießen des Sammelgel-Ansatzes in die Gelform mit Kamm (Ansatz

Sammelgel, s. Tab. 10). Nach Aushärtung des Sammelgels für 30 Minuten wurden beide Gele sofort weiterverwendet und in die Gelelektrophorese-Kammer eingesetzt. Daraufhin wurde der Elektrophorese-Puffer in die Kammer eingefüllt. Aus den einzelnen Proteinproben wurden Anteile entsprechend 20 µg Gesamtproteingehalt entnommen, mit Proben-Puffer versetzt und bei fünf Minuten für 95 °C denaturiert und daraufhin kurzzeitig bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Anschließend erfolgten das Beladen des Sammelgels sowie das Auftragen eines Proteinmarkers. Leere Taschen wurden mit Proben-Puffer angefüllt. Der Gel-Lauf erfolgte bei 120 bis 200 V für 45 bis 90 Minuten.

**Tabelle 10:** Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels

10% Trenngel		Sammelgel	
Substanz	Volumen	Substanz	Volumen
H <sub>2</sub> O, bidest.	8 ml	H <sub>2</sub> O, bidest.	12,5 µl
1,5 M Trenngelpuffer	5 ml	0,5 M Sammelgelpuffer	0,6 µl
30% Acrylamid-Lösung	6,6 ml	30% Acrylamid-Lösung	0,6 µl
10% SDS	200 µl	10% SDS	1,3 µl
Zutaten vermischen, dann Zugabe von:		Zutaten vermischen, dann Zugabe von:	
10% APS	100 µl	10% APS	100 µl
TEMED	10 µl	TEMED	12 µl

Im nächsten Schritt wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen. Für das hier verwendete Nassblot-Verfahren wurde zunächst eine Nitrocellulosemembran im Blot-Puffer für fünf Minuten vorinkubiert sowie für den Vorgang notwendige Blot-Papiere und -Schwämme mit Blot-Puffer befeuchtet. Gel und Membran konnten nun zusammen in die Blot-Kassette eingebracht werden, umgeben von Blot-Papier, Blot-Schwämmchen und äußerer Lochplatte. Die Blot-Kassette wurde nun in die Blot-Kammer eingebracht und diese mit Towbin-Puffer angefüllt. Die Ausrichtung der Kassette bezüglich des elektrischen Felds wurde entsprechend der erwünschten Laufrichtung der Proteine gewählt (von Gel auf Membran). Das Blotten erfolgte bei 250 mA für ca. eine Stunde.

Alle Blockierungs- und Inkubationsschritte erfolgten auf dem Wiegeinkubator. Im Anschluss an das Blotten wurde die Nitrocellulosemembran in Milchpulver/TBS-T-Lösung für ca. eine Stunde blockiert, wobei der prozentual verwendete Milchpulveranteil in Abhängigkeit von den verwendeten Antikörpern variierte (s. Tabelle 11). Daraufhin erfolgte die Inkubation des ersten Antikörpers in für die einzelnen Erstantikörper spezifischer Konzentration (s. Tabelle 11) in der Blockierungslösung bei 4 °C über Nacht. Nach Waschen der Membran in Waschlösung (1x TBS-T) für dreimal zehn Minuten (dreimaliger Wechsel der Waschlösung) wurde die Membran erneut blockiert in 5% Milchpulver/TBS-T-Lösung. Nun konnte die Inkubation mit den Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpern in 2,5% Milchpulver/TBS-T-Lösung für 30 bis 60 Minuten erfolgen – wieder war die verwendete Antikörperkonzentration abhängig vom

verwendeten Zweitantikörper (s. Tabelle 11). Zum Abschluss wurde die Membran erneut für dreimal zehn Minuten unter Wechsel der TBS-T-Lösung gewaschen.

**Tabelle 11:** Übersicht zu den verwendeten Western Blot-Antikörpern

Antikörper	Blockierungslösung	Antikörperkonzentration und Inkubationszeit
<b>Erstantikörper</b>		
<b>AT2-R (EPR 3876)</b>	5% Milchpulver in TBS-T	1:2000 bei 4 °C über Nacht
<b>Goat-Anti-beta-Aktin</b>	5% Milchpulver in TBS-T	1:2000 bei 4 °C über Nacht
<b>Zweitantikörper</b>		
<b>Rabbit-Anti-Goat</b>	2,5% Milchpulver in TBS-T	1:4000 bei 20 °C für 45 Minuten
<b>Schwein-Anti-Rabbit</b>	2,5% Milchpulver in TBS-T	1:3500 bei 20 °C für 45 Minuten

Die Entwicklung des Western Blot-Films erfolgte auf Basis eines Chemolumineszenz-Verfahrens unter Verwendung des *ECLTM Western Blotting Detection Reagent Kits*. Innerhalb des Verfahrens wird der mit Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper genutzt, um eine Peroxidase-Reaktion mit Luminol zu katalysieren. Der Reaktionsprozess führt zur Emission von Licht, wobei die Emissionsstärke abhängig von der Zweitantikörpermenge ist. Dieser Zweitantikörper ist über den Erstantikörper mit dem spezifisch-gebundenen Protein auf der Blotmembran gebunden. Die Emissionsstärke erlaubt so Rückschlüsse auf die vorhandene Proteinmenge. Die zwei verschiedenen im Kit enthaltenen Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran daraufhin in die Reagenz-Lösung für eine Minute eingebracht. Daraufhin wurde die Membran abgetropft, in Folie eingelegt und in der Dunkelkammer auf einen Film aufgebracht. Die Expositionsdauer variierte in Abhängigkeit vom Antikörper und gewünschter Signalstärke zwischen Sekunden und mehreren Minuten. Nach Expositionszeit konnte die Entwicklung des Filmes in Entwicklerflüssigkeit erfolgen. Abschließend wurden die Marker auf dem Film eingezeichnet.

### 2.2.5 Statistische Berechnungen

Innerhalb der Auswertung der Stimulationsexperimente mittels qPCR wurde jede Probe hinsichtlich der Ubiquitin C, sowie der IL-6-Expression analysiert. Ubiquitin C zeigt als *housekeeping gene* ein konstantes Expressionsniveau in relativer Unabhängigkeit von Veränderungen der Außenbedingungen. Zunächst wurden der  $\Delta$ CT-Wert jeder Probe mittels  $\Delta$ CT = CT-Wert (IL-6) – CT-Wert (Ubiquitin C) bestimmt. Die so für die einzelnen Stimmulationsgruppen ermittelten Werte wurden anschließend mittels One-Way-Anova sowie Bonferroni-Post-hoc-Analyse verglichen. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde die Software GraphPad Prism 6 genutzt. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  als signifikant bzw. mit  $p < 0,001$  als hochsignifikant festgelegt.

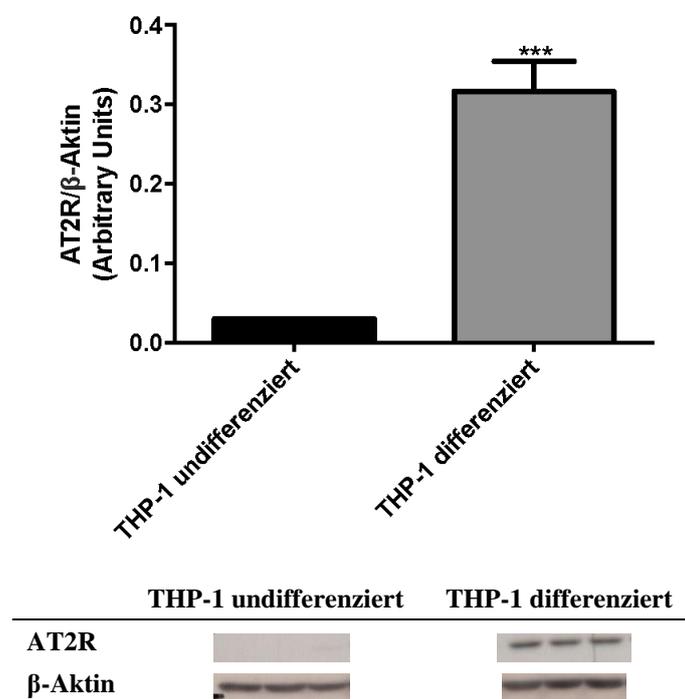
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Bestimmung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression in THP-1-Monozyten und -Makrophagen

Die Expression des AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Proteins wurde zunächst in undifferenzierten THP-1-Monozyten und differenzierten THP-1-Makrophagen mittels Western Blotting analysiert und verglichen. Das Differenzierungsprotokoll entsprach dem der Stimulationsexperimente und ist unter Kapitel 2.2.1 (Differenzierung der THP-1-Zellen) angegeben. In einem weiteren Schritt wurden differenzierte THP-1-Makrophagen in verschiedenen Stimulationsgruppen mit 50 ng/ml LPS (*E. coli*) bzw. 1  $\mu$ M C21 für sechs Stunden inkubiert. Mit Western Blotting konnte anschließend der Einfluss der LPS- bzw. C21-Stimulation auf die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression ermittelt werden.

##### 3.1.1 Einfluss der PMA-induzierten Zelldifferenzierung auf die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression in THP-1-Zellen

Die Differenzierung der THP-1-Monozyten zu -Makrophagen mittels Inkubation mit 0,5  $\mu$ mol/l des Phorbolesters PMA in Hungermedium führte zu einer mehr als zehnfachen Steigerung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expressionsrate im Western Blot ( $p = 0,0002$ ; s. Abb. 11).



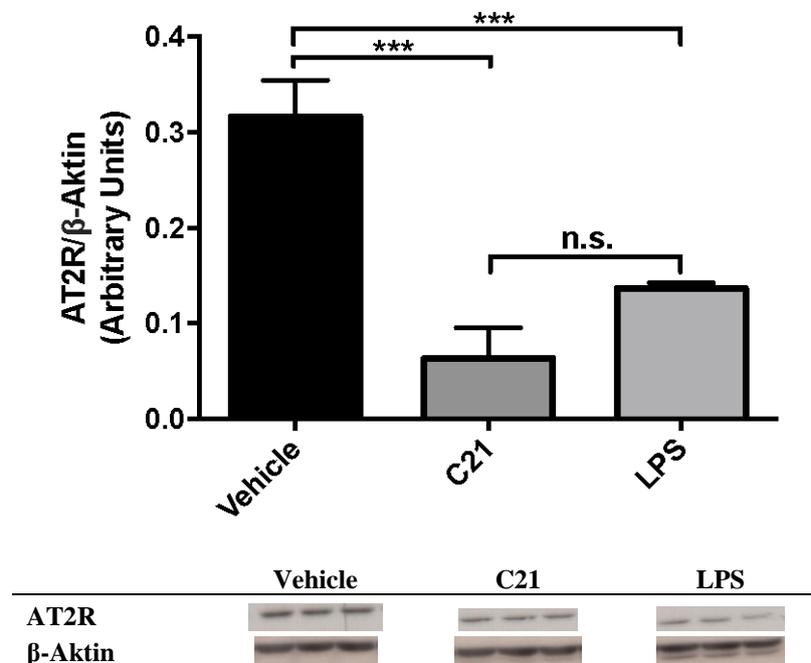
**Abb. 11: Einfluss der THP-1-Zelldifferenzierung auf die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression.** Darstellung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression in Relation zur Expression von  $\beta$ -Aktin. Mittels Western Blot wurde die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression in undifferenzierten und differenzierten THP-1-Zellen verglichen. Zur Differenzierung wurden THP-1-Monozyten für drei Stunden in Hungermedium mit 0,5  $\mu$ mol/l PMA inkubiert. Nach konsekutivem Ruheintervall von 24 Stunden in PMA-freiem Hungermedium erfolgte die Lyse der Zellen zur Auswertung. Differenzierte THP-1-Zellen zeigten eine auf 1055% gesteigerte AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Expressionsrate (Einzelexperiment, mean  $\pm$  SD;  $p = 0,0002$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 3.1.2 Einfluss von C21 auf die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression in THP-1-Makrophagen

PMA-differenzierte THP-1-Makrophagen wurden nach Stimulationsprotokoll (vgl. Kapitel 2.2.2) für sechs Stunden in Hungermedium mit 1  $\mu\text{mol/l}$  des AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten C21 inkubiert. Die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation führte zu einer Senkung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression um 80,00% ( $p = 0,0001$ ; s. Abb. 12).

### 3.1.3 Einfluss von LPS auf die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression in THP-1-Makrophagen

PMA-differenzierte THP-1-Makrophagen wurden nach Stimulationsprotokoll für sechs Stunden in Hungermedium mit 50 ng/ml LPS (*E. coli*) inkubiert. Die LPS-Inkubation führte zu einer Senkung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression um 56,84% ( $p = 0,0008$ ; s. Abb. 12).



**Abb. 12: Einfluss von AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonismus bzw. LPS-Stimulation auf die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression in THP-1-Makrophagen.** Darstellung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression in Relation zur Expression von  $\beta$ -Aktin. Mittels Western Blot wurde die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression PMA-differenzierter THP-1-Zellen mit der Expression nach C21- bzw. LPS-Stimulation verglichen. Die sechsstündige Inkubation differenzierter THP-1-Zellen in Hungermedium mit 1  $\mu\text{mol/l}$  des AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten C21 führte zu einer Senkung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression um 80,00% im Vergleich zu unstimulierten THP-1-Makrophagen (Einzelexperiment, mean  $\pm$  SD,  $p = 0,0001$ ). Die sechsstündige Inkubation differenzierter THP-1-Zellen in Hungermedium mit 50 ng/ml LPS (*E. coli*) führte zu einer Senkung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression um 56,84% im Vergleich zu unstimulierten THP-1-Makrophagen (Einzelexperiment, mean  $\pm$  SD;  $p = 0,0008$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

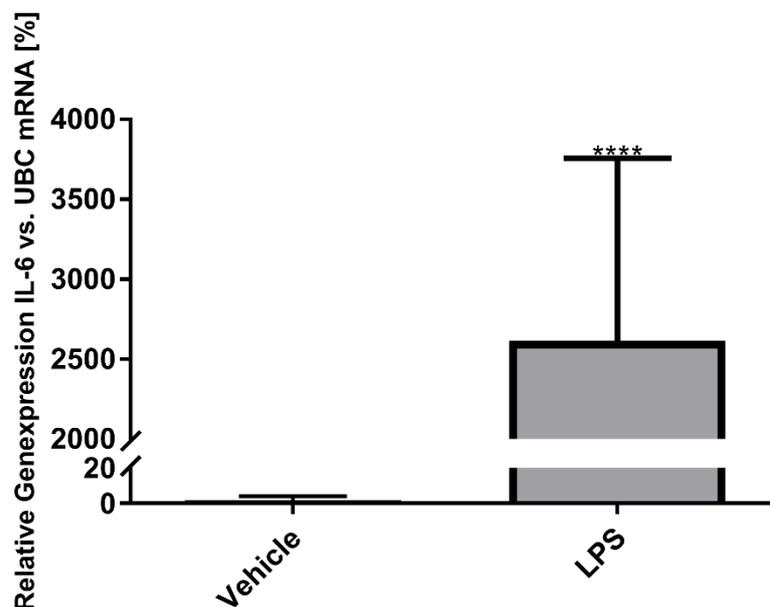
## 3.2 Stimulationsexperimente: Bestimmung der IL-6-mRNA-Expression in LPS-stimulierten THP-1-Makrophagen

THP-1-Monozyten wurden zunächst nach dem unter 2.2.1 genannten Protokoll mittels PMA zu Makrophagen differenziert. Anschließend erfolgte die Aufteilung der Zellen auf verschiedene Stimulationsgruppen. Als inflammatorischer Stimulus wurde den einzelnen Gruppen LPS 50 ng/ml zugesetzt. Zusätzlich erfolgte jeweils die Zugabe des etablierten AT<sub>2</sub>-Agonisten C21

bzw. eines neuen, potentiellen AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten mit  $c = 1\mu\text{mol/l}$  (JS5090, L162-389 und VR0008). Für jede Stimulationsgruppe aus LPS und Agonist wurde zusätzlich eine weitere Stimulationsgruppe aus LPS und Agonist, unter Vorinkubation des AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten PD123319 mit  $c = 10\mu\text{mol/l}$ , erstellt. Jede Stimulationsgruppe wurde in Triplets (drei Wells pro Stimulationsgruppe, s. Abb. 8) angelegt. Nach sechsständiger Inkubation erfolgten Zellernte, RNA-Isolation, cDNA-Synthese und schließlich Quantifizierung der IL-6-mRNA über qPCR. Die Qualität der RNA-Isolate wurde durch MOPS-Gelelektrophorese, die Qualität der aus den RNA-Isolaten synthetisierten cDNA durch TAE-Gelelektrophorese überprüft (s. digitaler Anhang). Für die qPCR wurde jede cDNA-Probe (entspricht cDNA-Produkt aus einem Well) in dreifacher Wiederholung pipettiert. Jedes Pharmakon wurde so insgesamt in mindestens drei individuellen Experimenten getestet. Als Referenz diente eine LPS-Stimulationsgruppe ohne Zusatz eines weiteren Pharmakons. Die statistische Analyse erfolgte über One-Way-Anova und Bonferroni-Post-hoc-Test. Zur besseren Übersicht erfolgt die Ergebnisdarstellung der Einzelerperimente für die jeweiligen Substanzen getrennt. Im Folgenden werden zunächst die IL-6-mRNA-Expression in unstimulierten und LPS-stimulierten THP-1-Makrophagen verglichen (ungepaarter T-Test).

### 3.2.1 Einfluss von LPS auf die IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen

Die Inkubation von PMA-differenzierten THP-1-Makrophagen mit LPS 50 ng/ml für sechs Stunden führte zu einer Steigerung der IL-6-mRNA-Expression um etwa das 1.600-fache im Vergleich zu unstimulierten THP-1-Makrophagen (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; s. Abb. 13).

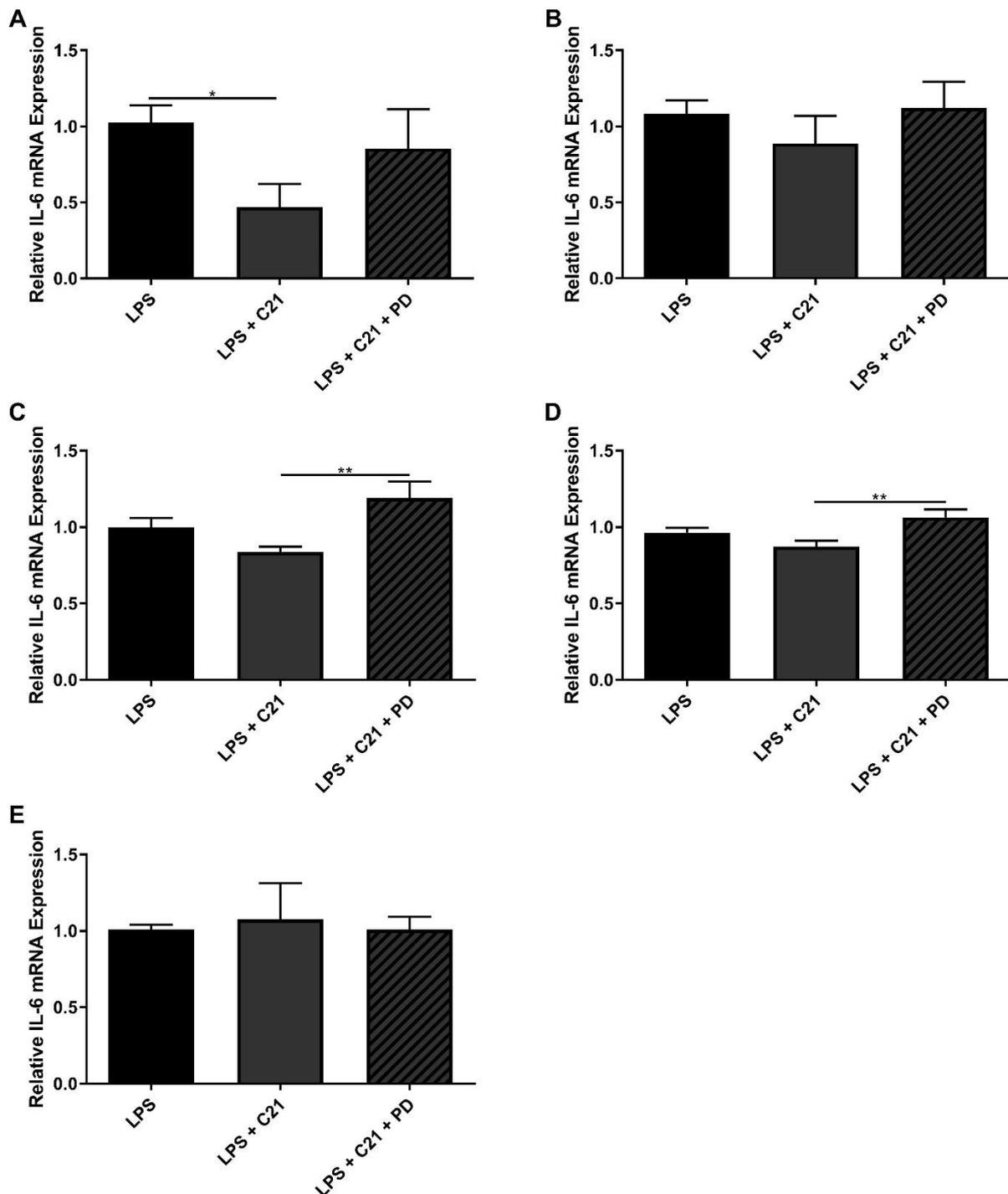


**Abb. 13: Einfluss von LPS auf die IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen.** Darstellung der IL-6-mRNA-Expression in Relation zur Expression von UBC-mRNA. Mittels qPCR wurde die IL-6-mRNA-Expression unstimulierter THP-1-Makrophagen mit der IL-6-mRNA-Expression von THP-1 nach Inkubation mit LPS verglichen. Die sechsständige Inkubation differenzierter THP-1-Zellen in Hungermedium mit 50 ng/ml LPS führte zu einer Steigerung der IL-6-mRNA-Expression um das etwa 1.600-fache der Expression in unstimulierten THP-1-Makrophagen. Darstellung von zusammengefassten Daten aus 4 individuellen Experimenten. (mean  $\pm$  SD; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

---

### 3.2.2 Einfluss von C21 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen

Die Inkubation PMA-differenzierter Makrophagen mit 1  $\mu\text{mol/l}$  des etablierten  $\text{AT}_2$ -Rezeptor-Agonisten C21 konnte keine durchgehende signifikante Reduktion der LPS-induzierten IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen zeigen (s. Abb. 14): In Experiment A wurde zunächst eine signifikante Senkung der IL6-mRNA-Expression um ca. 54% im Mittel ( $p = 0,0311$ ;  $* p < 0,05$ ) nachweisbar. Die Vorinkubation von PD123319 führte jedoch zu keiner signifikanten Antagonisierung des C21-vermittelten Effekts ( $p = 0,1293$ ). Experiment C und D konnten keine signifikante Reduktion der IL-6-mRNA-Expression bei Stimulation mit C21 nachweisen. Die Vorinkubation von 10  $\mu\text{mol/l}$  PD123319 führte dort jedoch zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-mRNA-Expression um etwa 42% (C) bzw. 22% (D) im Vergleich zur C21-Stimulationsgruppe (C:  $p = 0,0034$ ; D:  $p = 0,0038$ ;  $** p < 0,01$ ). Die Experimente B und E zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede innerhalb der Stimulationsgruppen.

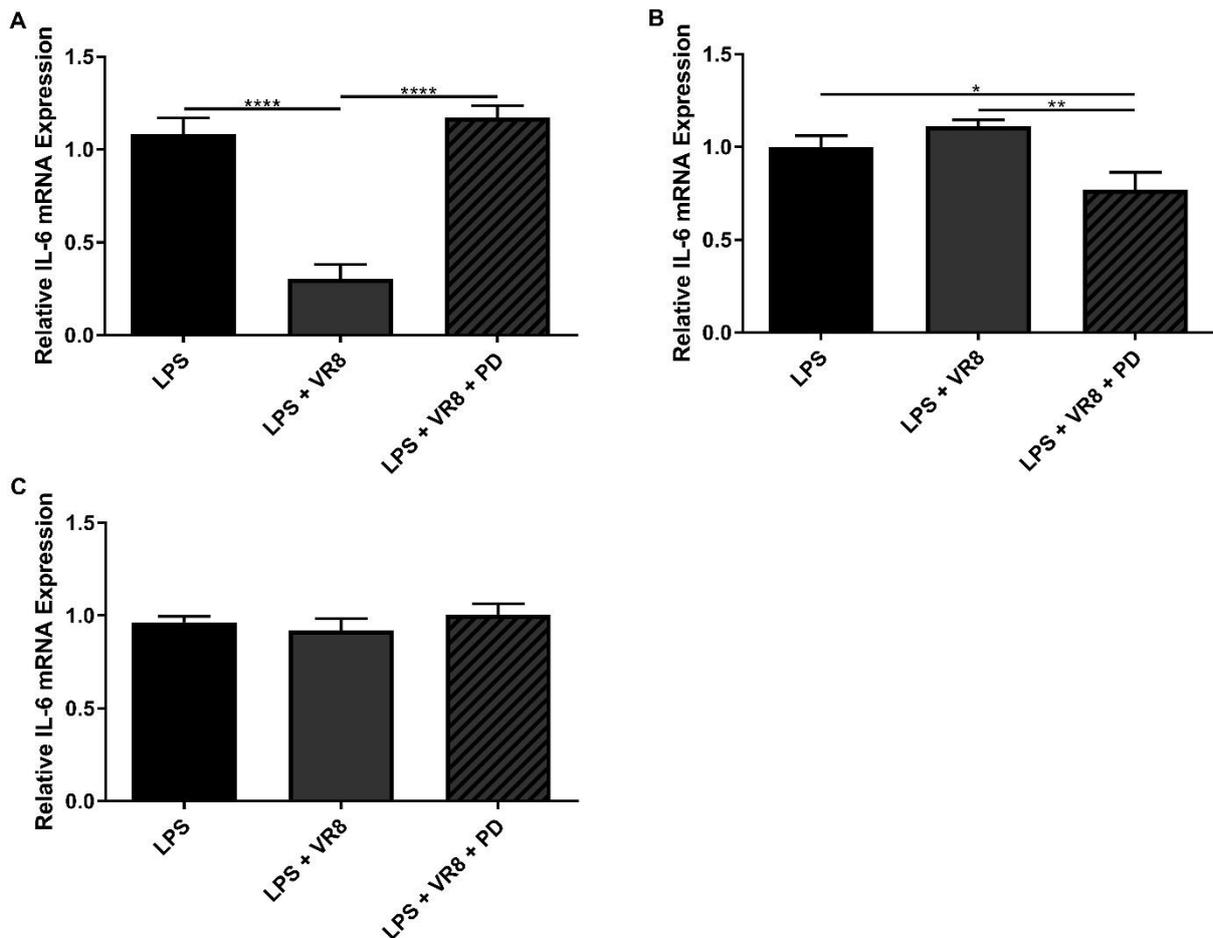


**Abb. 14: Einfluss von C21 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen.** Darstellung der IL-6-mRNA-Expression in Relation zur IL-6-mRNA-Expression der LPS-Stimulationsgruppe (= 100%). Mittels qPCR wurde der Effekt einer sechsstündigen Stimulation mit 1  $\mu\text{mol/l}$  C21 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression PMA-differenzierter THP-1-Zellen getestet. Darstellung der fünf Einzelexperimente A, B, C, D und E (mean  $\pm$  SD; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

### 3.2.3 Einfluss von VR0008 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen

Die sechsstündige Stimulation PMA-differenzierter Makrophagen mit 1  $\mu\text{mol/l}$  VR0008 zeigte unterschiedliche Effekte auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression innerhalb der

Einzelexperimente (s. Abb. 15): Experiment A zeigte eine signifikante Reduktion der IL6-mRNA-Expression um etwa 72% ( $p < 0,0001$ ). Die Vorinkubation von PD123319 führte hier zu einer vollständigen Aufhebung des VR0008-vermittelten Effekts ( $p < 0,0001$ ). Experiment B konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen der LPS- und der VR8-Stimulationsgruppe zeigen. Die Vorinkubation von 10  $\mu\text{mol/l}$  PD123319 führte jedoch zu einer signifikanten Senkung der IL-6-mRNA-Expression im Vergleich zur LPS-Stimulationsgruppe (um ca. 23%;  $p = 0,0175$ ) sowie im Vergleich zur VR0008-Gruppe (um etwa 31%;  $p = 0,023$ ). Experiment C zeigte keine signifikanten Expressionsunterschiede innerhalb der Stimulationsgruppen.

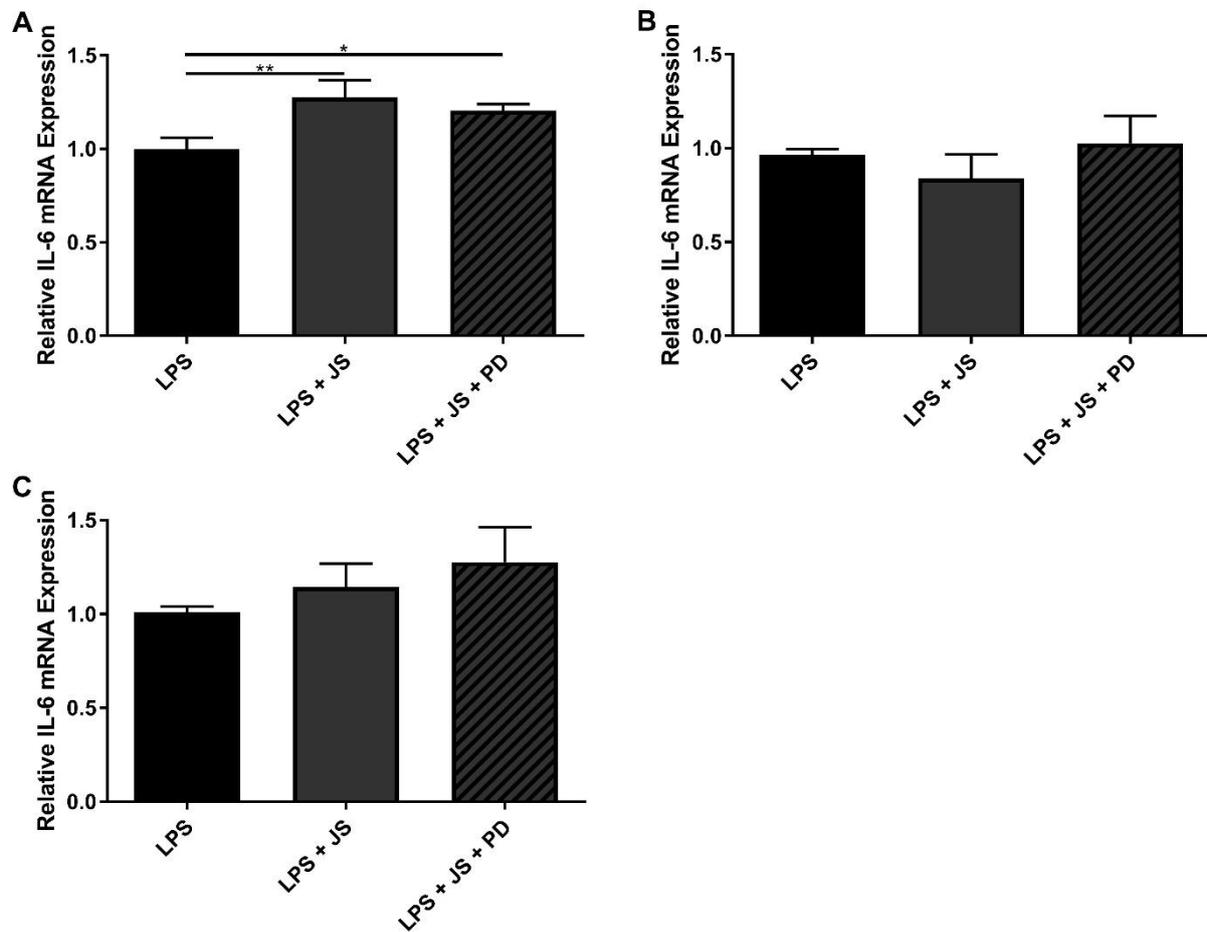


**Abb. 15: Einfluss von VR0008 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen.** Darstellung der IL-6-mRNA-Expression in Relation zur IL-6-mRNA-Expression der LPS-Stimulationsgruppe (= 100%). Mittels qPCR wurde der Effekt einer sechsständigen Stimulation mit 1  $\mu\text{mol/l}$  VR0008 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression PMA-differenzierter THP-1-Zellen getestet. Darstellung der drei Einzelexperimente A, B und C (mean  $\pm$  SD; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 3.2.4 Einfluss von JS5090 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen

Für die sechsständige Stimulation PMA-differenzierter Makrophagen mit 1  $\mu\text{mol/l}$  JS5090 konnte insgesamt keine signifikante Reduktion der LPS-induzierten IL-6-mRNA-Expression beobachtet werden (s. Abb. 16). Innerhalb Experiment A kam es zum signifikanten Anstieg der IL-6-mRNA-Expression in der JS5090-Gruppe (um ca. 28%;  $p = 0,0074$ ). Eine signifikant gesteigerte IL-6-mRNA-Expression zeigte sich auch bei Vorinkubation von 10  $\mu\text{mol/l}$  PD123319 im Vergleich zur

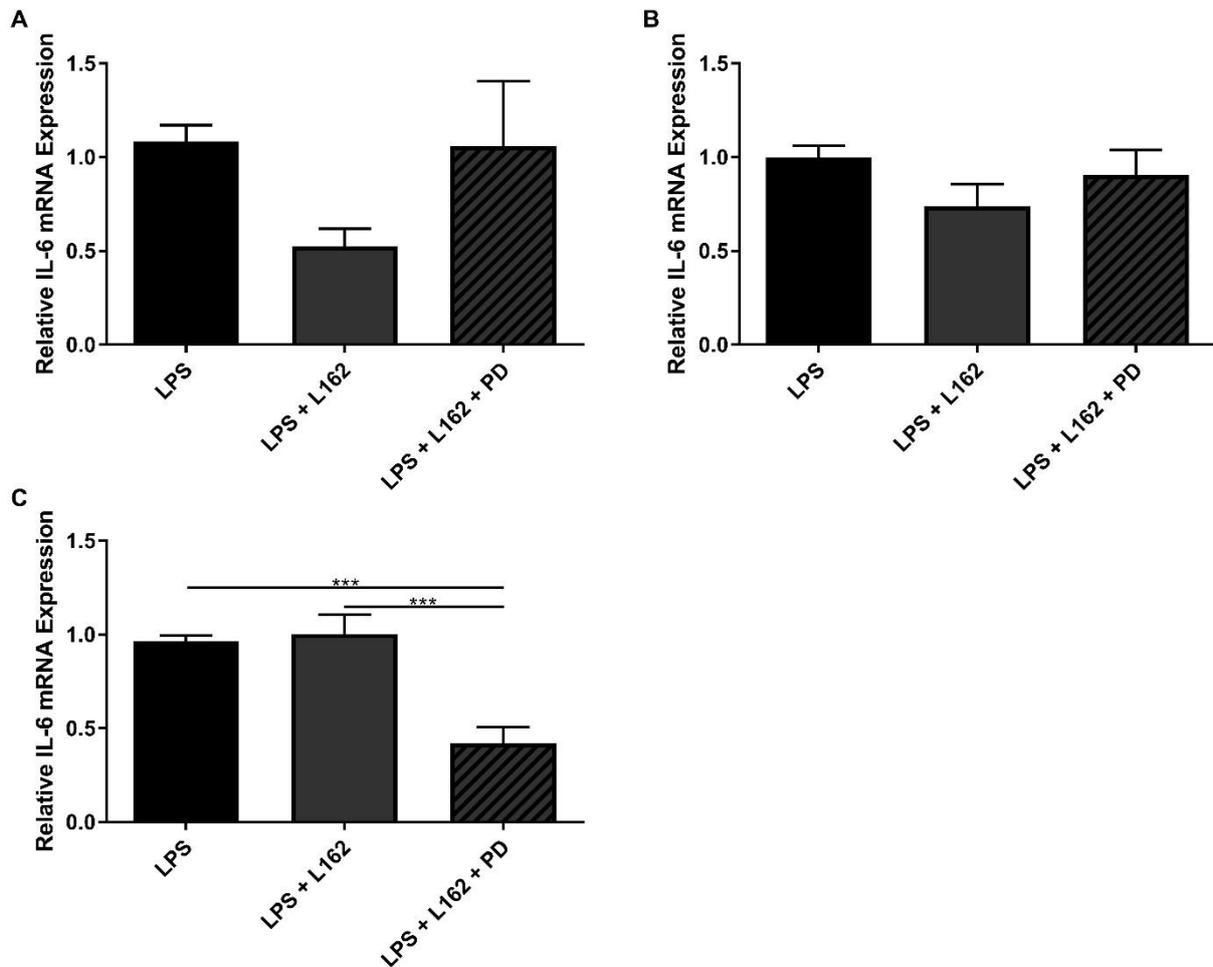
LPS-Stimulationsgruppe (um etwa 21%;  $p = 0,0294$ ). In Experiment B und C ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stimulationsgruppen nachweisen.



**Abb. 16: Einfluss von JS5090 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen.** Darstellung der IL-6-mRNA-Expression in Relation zur IL-6-mRNA-Expression der LPS-Stimulationsgruppe (= 100%). Mittels qPCR wurde der Effekt einer sechsständigen Stimulation mit  $1 \mu\text{mol/l}$  JS5090 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression PMA-differenzierter THP-1-Zellen getestet. Darstellung der drei Einzelexperimente A, B und C (mean  $\pm$  SD; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

### 3.2.5 Einfluss von L162-389 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen

Die sechsständige Stimulation THP-1-Makrophagen mit  $1 \mu\text{mol/l}$  L162-389 konnte, trotz tendenzieller Reduktion der IL-6-mRNA-Expression in Experiment A ( $p = 0,0559$ ) und B ( $p = 0,0775$ ), keine signifikante Reduktion der IL-6-mRNA-Expression im Vergleich zur LPS-Stimulationsgruppe zeigen (s. Abb. 17). In Experiment C führte die Vorinkubation mit  $10 \mu\text{mol/l}$  PD123319 zu einer signifikanten Senkung der IL-6-mRNA-Expression im Vergleich zur LPS-Gruppe (um ca. 57%;  $p = 0,0005$ ) sowie im Vergleich zur L162-389-Gruppe (um 58%;  $p = 0,0003$ ).



**Abb. 17: Einfluss von L162-389 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen.** Darstellung der IL-6-mRNA-Expression in Relation zur IL-6-mRNA-Expression der LPS-Stimulationsgruppe (= 100%). Mittels qPCR wurde der Effekt einer sechsständigen Stimulation mit 1  $\mu\text{mol/l}$  L162-389 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression PMA-differenzierter THP-1-Zellen getestet. Darstellung der drei Einzelexperimente A, B und C (mean  $\pm$  SD; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 4 Diskussion

Erkrankungen des zentralen Nervensystems gehören heute bereits zu den häufigsten Erkrankungen in Deutschland. Mit dem demographischen Wandel ist jedoch mit einer deutlichen Zunahme der Inzidenz neurologischer Erkrankungen zu rechnen: Bis 2050 wird der Anteil der über 65-Jährigen an der Gesamtbevölkerung von etwa 20% auf über 30% ansteigen<sup>70</sup>. Gleichsam wird sich der Prozentsatz der über 85-Jährigen an der Gruppe der über 65-Jährigen von aktuell etwa 10% auf über 20% erhöht haben<sup>70</sup>. Allein von 1995 bis 2007 hat sich so die Anzahl behandelter Patienten in neurologischen Facheinrichtungen auf etwa 900.000 im Jahr verdoppelt<sup>70</sup>. Die Therapie neurologischer Erkrankungen ist anspruchsvoll und langwierig, insbesondere da zahlreiche neurologische Erkrankungen zu bleibenden Beeinträchtigungen im Alltag und Pflegebedürftigkeit führen<sup>71</sup>: 2006 war jedes 10. Krankenbett in einer Vorsorge- oder Rehabilitationseinrichtung mit einem neurologischen Fallpatienten belegt<sup>70</sup>.

Der Entwicklung neuer Therapieansätze und -strategien zur Verbesserung der Behandlung neurologischer Erkrankungen kommt also eine besondere, letztlich auch gesundheitsökonomische Bedeutung zu. Dies schließt die Identifizierung von neuen, molekularen Ansatzpunkten der Pharmakotherapie mit ein. Wie bereits dargelegt, deutet Evidenz aus tierexperimentellen Modellstudien auf eine neuroprotektive Wirkung der pharmakologischen AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation<sup>37-51</sup>. Bislang war eine Evaluation AT<sub>2</sub>-abhängiger Effekte durch einen Mangel an AT<sub>2</sub>-Rezeptor-selektiven Pharmazeutika erschwert. Seit der Synthese von C21 steht ein hoch selektiver, nicht-peptidischer AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist zur Verfügung<sup>36</sup>. Es existieren bislang jedoch keine AT<sub>2</sub>-Agonisten, die in der Lage sind, die intakte Blut-Hirn-Schranke zu passieren<sup>60</sup>. Dies erschwert die Bewertung des therapeutischen Potentials der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation im Rahmen von Erkrankungen des ZNS. In den letzten Jahren wurden daher Versuche unternommen, neue AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten durch Abänderung der chemischen Struktur von C21 zu synthetisieren. Drei dieser Substanzen sind JS5090, L162-389 und VR0008. Prinzipiell besteht mit chemischer Alteration des Ausgangsmoleküls das Risiko des Verlustes der intrinsischen Aktivität am Zielrezeptor. Insofern ist eine Überprüfung der neuen Moleküle hinsichtlich dieser Eigenschaft am AT<sub>2</sub>-Rezeptor notwendig.

Ziel dieser Arbeit war es, ein bereits in primären Zellen (in humanen dermalen Fibroblasten) erprobtes Assay auf die monozytäre Zelllinie THP-1 zu übertragen und anschließend Aussagekraft und Praktikabilität des THP-1-Assays zur Überprüfung der intrinsischen Aktivität potentieller neuer AT<sub>2</sub>-Agonisten zu bewerten. Dafür erfolgte zunächst die Messung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression von THP-1-Zellen vor und nach PMA-abhängiger Differenzierung zu Makrophagen mittels Western Blot. Anschließend wurde der Einfluss von LPS und AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivierung auf die Rezeptor-Protein-Expression überprüft. Schließlich erfolgte die Evaluierung potentieller AT<sub>2</sub>-Agonisten mittels IL-6-Assay. Dafür wurden PMA-differenzierte THP-1-Makrophagen einem entzündlichen Stimulus (LPS) ausgesetzt. Unter der Annahme, dass ein intrinsisch aktiver AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expressionssteigerung abschwächt, wurden JS5090, L162-389 und VR0008 jeweils einzeln im Rahmen von Stimulationsexperimenten getestet. C21 diente als etablierter AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist als Referenzsubstanz. Um eine AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Abhängigkeit beobachteter anti-inflammatorischer

Effekte zu sichern, wurden Stimulationsexperimente unter AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Blockade mittels PD123319 durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels qPCR.

#### **4.1 PMA-abhängige Zelldifferenzierung, LPS und AT<sub>2</sub>-Agonisten als Einflussfaktoren auf die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression in THP-1-Zellen**

Mittels Western Blot wurde der Einfluss der PMA-abhängigen Differenzierung von THP-1-Monozyten zu Makrophagen, sowie der Einfluss von LPS, bzw. Compound 21 auf die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression von THP-1-Zellen untersucht. Da es sich um Ergebnisse eines Einzelerperimentes handelt, die nicht in Folgeexperimenten verifiziert wurden, ist die Interpretation der Daten nur eingeschränkt möglich.

##### **4.1.1 Die PMA-abhängige Differenzierung von THP-1-Monozyten zu Makrophagen führt zu Steigerung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression**

PMA-differenzierte THP-1-Makrophagen zeigten eine zehnfach gesteigerte AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression ( $p = 0,0002$ ) im Vergleich zu undifferenzierten THP-1-Monozyten. Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen von Okamura et al., die eine Heraufregulierung verschiedener Komponenten des RAAS in PMA-differenzierten THP-1-Zellen beschreiben: Die Arbeitsgruppe konnte eine 6,4-fache Steigerung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-mRNA 48 Stunden nach PMA-Differenzierung nachweisen. Dieser Effekt hielt für mindestens sieben Tage an<sup>67</sup>. Die PMA-abhängige Differenzierung von THP-1-Zellen ist also zunächst als Hilfsmittel zur Sensibilisierung der Zellen auf Substanzen mit pharmakodynamischem Ansatzpunkt innerhalb des RAAS geeignet. Allerdings beeinflusst PMA selbst die Genregulation der THP-1-Zellen und wirkt proentzündlich<sup>72,73</sup>. Die Dosierung und Inkubationsdauer von PMA sollte daher nicht allein hinsichtlich der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression gewählt werden. Ob und inwiefern PMA-freie THP-1-Differenzierungsprotokolle, z. B. unter Nutzung von Calcitriol, günstigen Einfluss auf die Expression von Komponenten des RAAS nehmen ist bislang nicht geklärt. Allerdings zeigen Calcitriol-differenzierte THP-1-Zellen eine geringere Responsivität auf LPS<sup>74</sup>.

##### **4.1.2 Einfluss der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation auf die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression**

Die sechsstündige Inkubation differenzierter THP-1-Makrophagen in Hungermedium mit 1  $\mu\text{mol/l}$  des AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten C21 führte zu einer Senkung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression um etwa 80% im Vergleich zu unstimulierten THP-1-Makrophagen ( $p = 0,0001$ ). Okamura et al. konnten bereits eine Senkung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor -mRNA-Expression in THP-1-Zellen um mehr als 50% nach 24-stündiger Angiotensin II-Inkubation zeigen. Bei etwa gleicher Affinität von Angiotensin II für den AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptor und einer höheren Expression von AT<sub>1</sub>-Rezeptoren ist hier jedoch von einem AT<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängigen Effekt auszugehen. Das Niveau der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-mRNA-Expression nach einer achtstündigen Angiotensin II-Inkubation verblieb außerdem konstant<sup>67</sup>. In einem zu dieser Arbeit vergleichbaren Versuchsaufbau fanden Menk et al. keine Hinweise auf eine Beeinflussung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression im Western Blot durch Inkubation von THP-1-Zellen mit LPS oder einem AT<sub>2</sub>-Agonisten. Diese Diskrepanz kann

möglicherweise durch methodische Unterschiede in der Durchführung des Assays erklärt werden: Das PMA-Differenzierungsprotokoll ähnelt dem Protokoll dieser Arbeit, inklusive Inkubationszeit und PMA-Dosis. Auch die eingesetzten Dosen von LPS und C21 zur Stimulation sind vergleichbar. Jedoch sind die Stimulationszeiten unterschiedlich (sechs vs. zwölf Stunden). THP-1-Zellen dieser Arbeit wurden in Kulturmedium mit Penicillin und Streptomycin gehalten, wohingegen Menk et al. mit Antibiotika-freien Medien arbeiteten. Zusätzlich bestehen verschiedene Bezugsquellen der THP-1-Zellen (ATCC in den USA bzw. DSMZ in Deutschland). Unterschiede finden sich auch in der Wahl der für die Quantifizierung des AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Proteins verwendeten Antikörper: Menk et al. nutzten polyklonale Anti-Maus-AT<sub>2</sub>R-Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology, deren AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Spezifität zuletzt in Frage gestellt wurde<sup>75</sup>.

### **4.1.3 Die Stimulation von THP-1-Makrophagen mit LPS führt zur Reduktion der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression**

Auch die sechsstündige Inkubation differenzierter THP-1-Zellen in Hungermedium mit 50 ng/ml LPS (*E. coli*) führte in dieser Studie zu einer Senkung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression um etwa 56,84% ( $p = 0.0008$ ). Die LPS-induzierte Senkung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression erschwert somit möglicherweise den Nachweis AT<sub>2</sub>-Rezeptor-abhängiger Effekte im THP-1-Assay, da der durch PMA-Differenzierung induzierten Steigerung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression bedeutend entgegengewirkt wird. Auch unter Berücksichtigung der zuvor erwähnten widersprüchlichen Ergebnisse<sup>76</sup> sollten Maßnahmen zur Sicherstellung bzw. Dokumentation einer konstanten Expression des AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Proteins bei Durchführung des Assays getroffen werden. Letzten Endes käme auch ein Wechsel der Stimulationssubstanz in Frage: Okamura et al. konnten für eine Inkubation von THP-1-Makrophagen mit verschiedenen Zytokinen für 24 Stunden, darunter z. B. IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$ , keine Alteration der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-mRNA-Expression feststellen<sup>67</sup>. Weitere Experimente zur Charakterisierung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression unter Stimulation mit pro-inflammatorischen Substanzen sind somit notwendig.

## **4.2 Evaluierung potentieller AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten mittels IL-6-Assay**

### **4.2.1 Bewertung der Pharmazeutika hinsichtlich ihrer Aktivität am AT<sub>2</sub>-Rezeptor**

Zur Identifizierung von AT<sub>2</sub>-Agonisten unter den Blut-Hirn-Schranke-gängigen Substanzen JS5090, L162-389 und VR0008 wurden die LPS-Stimulationsexperimente an PMA-differenzierten THP-1-Makrophagen wie im Vorherigen beschrieben durchgeführt. Die Abschwächung der LPS-induzierten IL6-mRNA-Expressionssteigerung sollte die intrinsische Aktivität der Substanz am AT<sub>2</sub>-Rezeptor zeigen, was gleichzeitig auch einen Hinweis auf eine genügende Affinität am Rezeptor erbringen würde. Die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Selektivität etwaiger Effekte sollte durch die Blockade mittels AT<sub>2</sub>-Antagonist PD123319 belegt werden.

Weder JS5090 noch L162-389 oder VR0008 konnten innerhalb dieser Studie sicher als AT<sub>2</sub>-Agonisten verifiziert werden. Im Rahmen der Testung der jeweiligen Pharmazeutika in jeweils drei unabhängigen Experimenten war keine reproduzierbare signifikante und AT<sub>2</sub>-Rezeptor-abhängige Absenkung der IL-6-mRNA-Expression nach LPS-Stimulation nachzuweisen. Eine abschließende Bewertung der Substanzen hinsichtlich ihrer intrinsischen Aktivität ist allerdings

aus mehreren Gründen erschwert: Ein zentrales Problem ist, dass auch für den etablierten AT<sub>2</sub>-Agonisten C21, der eine hohe AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Affinität besitzt, trotz tendenzieller Effekte, keine reproduzierbare signifikante Absenkung der LPS-induzierten IL-6-mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu konnten Menk et al. in einem vergleichbaren Versuchsaufbau eine signifikante Senkung der LPS-induzierten IL-6-, IL-10- und TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression durch dreistündige Inkubation von THP-1-Makrophagen mit C21 feststellen<sup>76</sup>. Dieser signifikante Effekt war nach sechs- bzw. zwölfstündiger Inkubation nicht mehr zu beobachten, da die entzündliche Antwort der THP-1-Zellen auf den LPS-Stimulus bereits zum größten Teil abgeklungen war. Es kann folglich argumentiert werden, dass mit der Wahl einer sechsstündigen Inkubationszeit in dieser Studie die „Spitze“ der entzündlichen Reaktion und somit möglicherweise ein signifikanter antiinflammatorischer Effekt durch C21 verpasst wurde. In der wissenschaftlichen Literatur finden sich jedoch systematische Untersuchungen, die für die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Zellen einen klaren Expressionsgipfel bei sechs Stunden beschreiben<sup>68</sup>. Diese Abweichungen sind angesichts der methodischen Homogenität dieser zu der von Menk et al. publizierten Studie nur schwer zu erklären. Übereinstimmungen bestehen im Differenzierungs- und Zellkulturprotokoll sowie der für die Stimulation gewählten Dosis von C21 und LPS (*E. coli*). Möglicherweise sind wiederum unterschiedliche Bezugsquellen der THP-1-Zellen (ATCC in den USA bzw. DSMZ in Deutschland) für die beobachteten Differenzen verantwortlich. So ist zu vermuten, dass, seit Etablierung der THP-1-Zelllinie und deren weltweiter Verbreitung, Sublinien entstanden sind, die sich nun über Häufung von Spontanmutationen im Rahmen der Zellpassagen molekularbiologisch voneinander unterscheiden. Die molekulargenetischen Unterschiede zwischen THP-1-Zellen der Anbieter ATCC und DSMZ bzw. deren Einfluss auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression sind jedoch bislang nicht systematisch untersucht worden.

#### **4.2.2 Problematik der Nutzung von PD123319 zum Nachweis AT<sub>2</sub>-Rezeptor-abhängiger Effekte**

In der hier dargelegten Studie wurde der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist PD123319 eingesetzt, um die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Selektivität von etwaigen Effekten der getesteten Substanzen zu verifizieren. So konnte zum Beispiel in zwei von fünf Experimenten der Effekt von C21 auf die IL-6-mRNA-Expression (der statistisch allerdings nicht signifikant war) durch PD123319 signifikant gehemmt werden (s. Abb. 14C und D). In zwei weiteren Experimenten führte die Inkubation mit PD123319 zu einer statistisch nicht signifikanten Hemmung der Effekte von C21 (s. Abb. 14A und B). Diese Beobachtungen sind mit einem möglichen AT<sub>2</sub>-Rezeptor-abhängigen, antiinflammatorischen Effekt durch C21 zu vereinbaren, wie er bereits von Menk et al. beschrieben wurde<sup>76</sup>. In einigen der Experimente (s. Abb. 14C und D, 15A, 16A und C) lag die IL-6-mRNA-Expression in der PD123319-Gruppe über der in der LPS-Gruppe. Dieser, wenngleich bis auf eine Ausnahme (s. Abb. 16A) statistisch nicht signifikante Effekt wäre prinzipiell erklärbar mit einer Blockade der konstitutiven, intrinsischen Aktivität des AT<sub>2</sub>-Rezeptors durch PD 123,319, die auch in Zellen, die nicht mit einem AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten stimuliert wurden, zu einer *background*-Hemmung der IL-6-mRNA-Expression geführt haben könnte. Die konstitutive, intrinsische Aktivität des AT<sub>2</sub>-Rezeptors ist in der Tat in der Literatur beschrieben<sup>77</sup>.

In den Versuchen mit VR0008 und L612-389 kam es jeweils einmalig zur überraschenden signifikanten Absenkung der IL-6-mRNA-Expression der PD123319-Gruppe im Vergleich zur LPS-Gruppe. Diese Effekte können nicht mit AT<sub>2</sub>-Rezeptor-unabhängigen, anti-entzündlichen Wirkungen von VR0008 bzw. L612-389 erklärt werden, da die Substanzen für sich allein keine signifikante Absenkung der IL-6-mRNA induzierten. Eine Interpretation der Daten i. S. einer Interaktion von PD123319 mit den hier genannten Pharmazeutika kann aufgrund dieser einmalig nachgewiesenen Effekte nicht sicher erfolgen.

Insgesamt wird die Verwendung von PD123319 zur Antagonisierung AT<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelter Effekte in der wissenschaftlichen Gemeinde z. T. kontrovers diskutiert: Die Substanz hat zwar eine hohe Affinität für den AT<sub>2</sub>-Rezeptor<sup>78</sup>, ist aber wahrscheinlich ein partieller Agonist. Agonistische Effekte sind z. B. durch Wagenaar et al. beschrieben worden<sup>30,79</sup>. Zudem gibt es Zweifel an der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Selektivität der Substanz. Obwohl dies nicht den AT<sub>1</sub>-Rezeptor betrifft, für den PD123319 nur eine sehr geringe Affinität aufweist, konnten Lautner et al. zeigen, dass PD123319 als Antagonist des kürzlich entdeckten Alamandine-Rezeptors MrgD wirkt<sup>80</sup>. Darüber hinaus diskutieren Villela et al. mögliche antagonistische Effekte des Moleküls am Mas-Rezeptor<sup>81</sup>. In einem Maus-Modell der Angiotensin II-abhängigen Induktion abdominaler Aortenaneurysmata führte PD123319-Koadministration AT<sub>2</sub>-Rezeptor-unabhängig zur signifikanten Steigerung der Aneurysma-Inzidenz<sup>82</sup> – die molekularen Mechanismen dieses Effekts blieben jedoch ungeklärt. Vor diesem Hintergrund erscheint die Verwendung eines alternativen AT<sub>2</sub>-Antagonisten als wünschenswert. Allerdings steht nur eine einzige weitere etablierte Substanz zur Verfügung: PD123199. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu PD123319 sollte auch bei dieser Substanz die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Selektivität kritisch hinterfragt werden. Eine weitere Alternative könnte zukünftig die nicht-peptidische Substanz C38/M132 darstellen, für die ein AT<sub>2</sub>-Antagonismus nachgewiesen werden konnte<sup>83</sup>. Zusätzlich wurde ein weiterer Nicht-Peptid-Antagonist des AT<sub>2</sub>-Rezeptors durch strukturelle Alteration von C38/M132 beschrieben<sup>84</sup>. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass bislang nur wenig experimentelle Erfahrung für diese Moleküle vorliegt und bis heute vornehmlich PD123319 als AT<sub>2</sub>-Antagonist genutzt wird.

### 4.2.3 Methodische Heterogenität und Störfaktoren des THP-1-Assays in der Literatur

Bei Sichtung der bestehenden wissenschaftlichen Literatur offenbaren sich große methodische Unterschiede in der Arbeit mit THP-1-Makrophagen (Tabelle 12 zeigt die wichtigsten Eckdaten der Zelldifferenzierung und Stimulationsexperimente dieser Arbeit). So existieren bis heute keine standardisierten Protokolle für die verbreitete PMA-abhängige Differenzierung von THP-1-Zellen<sup>73</sup>. Die verwendeten Dosen von PMA rangieren in einem Bereich von 10 bis 400 ng/ml (in dieser Studie etwa 300 ng/ml)<sup>73</sup>. Dabei sind PMA-Inkubationszeiten von wenigen Stunden bis über mehrere Tage beschrieben<sup>72</sup>. Die Nutzung und Dauer von sogenannten *recovery periods*, also Inkubationsintervallen mit PMA-freiem Medium, ist uneinheitlich: So können PMA-freie Intervalle einige Stunden bzw. bis zu 10 Tage andauern<sup>72</sup>. Alle genannten Variablen der THP-1-Differenzierungsprotokolle

nehmen letztlich Einfluss auf Phänotyp und Funktion der THP-1-Makrophagen<sup>72</sup>. Bislang wurden lichtmikroskopischer Phänotyp und Adhäsivität der THP-1-Zellen als Indikatoren einer vollständigen Differenzierung zu THP-1-Makrophagen genutzt. Sie können jedoch keine genaue Aussage zur Zusammensetzung der Makrophagen-Population und ihrer biologischen Aktivität erbringen<sup>72</sup>.

Die Nutzung höherer PMA-Dosen zur Differenzierung erscheint insgesamt nachteilig: Maess et al. konnten zeigen, dass eine 48-stündige PMA-Differenzierung in Dosen von 100 ng/ml zu einer Voraktivierung von THP-1-Makrophagen über den CCR7-Rezeptor führt. Die Responsivität auf entzündliche Stimuli wie TNF- $\alpha$  und LPS wurde so abgeschwächt<sup>85</sup>. Die Reduktion der PMA-Dosis auf 10 ng/ml für 48 Stunden sowie 2,5 ng/ml PMA für weitere 24 Stunden konnte hingegen die vollständige Differenzierung naiver THP-1-Makrophagen gewährleisten und die Responsivität der Zellen erhöhen<sup>85</sup>. Erhöhte PMA-Konzentrationen steigern darüber hinaus dosisabhängig die Expression verschiedener Zytokine und Chemokine und wirken damit selbst pro-entzündlich (z. B. TNF- $\alpha$ , IL-8, MIP-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )<sup>73</sup>. Eine Reduktion der PMA-Dosis macht letztlich die Detektion entzündlicher Antworten, auch auf schwächere Stimuli, möglich<sup>73</sup>. Die hier zitierten Autoren sind sich daher einig, dass die PMA-Dosis bei THP-1-Differenzierung insgesamt niedrig gehalten werden sollte, wobei die exakte Dosierung und die einzelnen Inkubationszeiträume auch unter diesen Publikationen voneinander abweichen<sup>72,73,85</sup>. Erfolgreiche Differenzierungen sind schon ab PMA-Dosen von 8 bis 25 nmol/l beschrieben<sup>72</sup>. Dies entspräche einer Reduktion der in dieser Studie verwendeten PMA-Konzentration auf unter 5% der Ausgangsdosis.

Unterschiede bestehen ferner bezüglich der Substanzen, die zur Induktion der entzündlichen Antwort in THP-1-Makrophagen genutzt werden. So werden verschiedene Zytokine (z. B. TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$ ), jedoch auch eine Vielzahl anderer Moleküle (z. B. Fettsäuren, Amyloid- $\beta$ ) verwendet.

**Tabelle 12:** Eckdaten der THP-1-Differenzierung und -Stimulation

<b>THP-1-Zellen</b>	
<i>Bezugsquelle:</i>	ATCC, USA
<b>Differenzierung</b>	
<i>PMA-Dosis:</i>	0,5 $\mu$ mol/l bzw. 300 ng/ml
<i>Inkubationszeit:</i>	3 Stunden
<i>Recovery period:</i>	24 Stunden
<b>Stimulation</b>	
<i>LPS-Spezies:</i>	E. coli
<i>LPS-Dosis:</i>	50 ng/ml
<i>Dosis Agonist:</i>	1 $\mu$ M
<i>Dosis Antagonist:</i>	10 $\mu$ M
<i>Inkubationszeit:</i>	6 Stunden

Zu den am häufigsten verwendeten Substanzen zählen LPS, also bakterielle Zellwandbestandteile, die direkt, z. B. über den Toll-like-Rezeptor 4-MD-2-Rezeptor-Komplex, von THP-1-Zellen erkannt werden. LPS induzieren MyD88-abhängig die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, welche zu einer Stimulation der Transkription und Synthese vom pro-inflammatorischen Zytokin TNF- $\alpha$  sowie zur Vermittlung Typ-1-T-Helferzell-abhängiger Immunantwort führt<sup>86</sup>. In einem weiteren Signalweg induzieren LPS TRIF-abhängig die Bildung von IFN- $\gamma$  und Stickstoffmonoxid<sup>86</sup>. Die Nutzung von LPS ist hinsichtlich der Notwendigkeit der interexperimentellen Vergleichbarkeit bzw. Reproduzierbarkeit für das hier verwendete Assay problematisch: Gaekwad et al. beschreiben eine heterogene Immunantwort monozytärer Zellen auf Lipid A, einer hydrophoben Domäne innerhalb des LPS-Moleküls, die den eigentlichen inflammationsinduzierenden Bestandteil von LPS bildet<sup>86,87</sup>. So zeigen sich deutliche Abweichungen der Lipid A-Struktur innerhalb verschiedener Bakterienstämme, die mit signifikanten Unterschieden bezüglich der entzündlichen Potenz sowie des Zytokin-Expressionsmusters (z. B. von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) einhergehen<sup>86</sup>. Die dabei bedienten Signalwege können völlig voneinander abweichen: So aktivieren z. B. LPS von *Vibrio cholerae* selektiv MyD88-abhängige Signalwege, wohingegen LPS von *Salmonella Typhimurium* MyD88-unabhängige Signalwege vermitteln<sup>86</sup>. Auch Mathiak et al. beschreiben abweichende Zytokin-Expressionsmuster von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\mu$ , IL-10 und MCP-1 im *whole-blood*-Assay, in Abhängigkeit von der Ursprungsspezies der LPS<sup>88</sup>. Doch auch bei ausschließlicher Nutzung von LPS eines bestimmten Bakterienstammes ist eine deutlich abweichende entzündliche Potenz zwischen verschiedenen LPS-Chargen desselben Herstellers laborpraktischer Alltag. Möglicherweise ist diese Beobachtung u. a. auf eine Kontamination der LPS-Isolate durch andere, pro-entzündliche Zellwandbestandteile zurückzuführen<sup>86</sup>. Da ein Wechsel der LPS-Charge auch im Rahmen dieser Experimentreihe erfolgen musste, sind diese Erkenntnisse für die Interpretation der Ergebnisse von besonderer Relevanz.

Abschließend sollte angemerkt werden, dass für Differenzierungsprotokolle mit erhöhter PMA-Dosis inkonsistente entzündliche Antworten der THP-1-Zellen auf LPS-Stimuli belegt wurden: So konnten Lund et al. nachweisen, dass mit hoher PMA-Dosis (50 bis 100 nM) differenzierte THP-1-Zellen mit schwankender entzündlicher Antwort (Anstieg TNF- $\alpha$ -Expression) auf niedrige LPS-Dosen (10 ng/ml LPS) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Stimulation nach PMA-Inkubation reagierten<sup>72</sup>. Eine Niedrigdosis-PMA-Differenzierung (8 bis 25 nM) führte jedoch zu einer stabilen, entzündlichen Antwort auf Stimulation durch LPS mit Dosen zwischen 10 bis 100 ng/ml über bis zu fünf Tage nach Differenzierung<sup>72</sup>. Somit kann der zeitliche Abstand zwischen THP-1-Differenzierung und Stimulationsexperiment eine weitere Einflussgröße auf die entzündliche Antwort der THP1-Zellen auf LPS-Stimulation darstellen.

#### **4.2.4 Vereinheitlichung des THP-1-Assays zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit**

Ziel dieser Dissertationsarbeit war die Etablierung eines In-vitro-Assays zur Testung neuer ZNS-gängiger Pharmazeutika auf ihre intrinsische Aktivität am AT<sub>2</sub>-Rezeptor. Dafür wurde ein bereits von Rompe et al. etabliertes IL-6-Assay auf die monozytäre Zelllinie THP-1<sup>22</sup> übertragen. Mit der Verwendung einer Zelllinie im Gegensatz zu primären Zellen sollten die Vereinfachung des Versuchsprotokolls und die damit verbundene Kostenreduktion eine Durchführung des Assays bei hohem Substanzdurchlauf ermöglichen. Darüber hinaus wurde der Anspruch auf eine gute

Reproduzierbarkeit mit insgesamt konsistenten Versuchsergebnissen gestellt. Obwohl die in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe entstandene Publikation von Menk et al. zeigt, dass ein Nachweis agonistischer Aktivität am AT<sub>2</sub>-Rezeptor prinzipiell möglich ist, konnte diese Arbeit für den etablierten AT<sub>2</sub>-Agonisten C21 sowie für die Substanzen JS5090, L162-389 und VR0008 keine kongruent signifikante Reduktion der LPS-induzierten IL-6-mRNA-Expression nachweisen. Somit ist eine Bewertung der neuen ZNS-gängigen Pharmazeutika JS5090, L162-389 und VR0008 hinsichtlich ihrer intrinsischen Aktivität am AT<sub>2</sub>-Rezeptor nicht sicher möglich. Wie bereits ausführlich im vorhergehenden Abschnitt diskutiert, erschweren eine Vielzahl nachgewiesener methodischer Einflussfaktoren die Reproduktion von Ergebnissen. Vor diesem Hintergrund erscheint das IL-6-THP-1-Assay als einfaches Hochdurchsatz-Screening-Verfahren potentieller AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten ungeeignet. Eine Verwendung des Assays zur Untersuchung der physiologischen Funktionen des AT<sub>2</sub>-Rezeptors bzw. des RAAS in Makrophagen erscheint dennoch sinnvoll, da THP-1-Zellen in vielen physiologischen Kernaspekten primären Monozyten bzw. Makrophagen ähneln<sup>89</sup>. Einer Übertragung der im Assay gesammelten Erkenntnisse auf In-vivo-Verhältnisse sollte jedoch prinzipiell eine Überprüfung in primären Zellen vorausgehen. Darüber hinaus sind eine Anzahl methodischer Optimierungen notwendig, um die Reliabilität und Reproduzierbarkeit des Assays zu verbessern.

Von zentraler Bedeutung erscheint dabei die Vereinheitlichung des PMA-Differenzierungsprotokolls, die bereits von Maess et al. sowie Lund et al. angeregt wurde. Die Reduktion der PMA-Dosis auf die niedrigste für eine vollständige und stabile Zelldifferenzierung notwendige Dosis, attenuiert den u. a. pro-inflammatorischen Einfluss von PMA auf die RNA- und Protein-Expression der THP-1-Makrophagen und sensibilisiert diese für schwächere, entzündliche Stimuli<sup>72,73,85</sup>. Da lichtmikroskopische Morphologie und Oberflächenadhäsion nur grobe Marker des Differenzierungsprozesses darstellen, sollten weitere Kontrollmechanismen der THP-1-Zelldifferenzierung zur genauen Charakterisierung von THP-1-Makrophagen und deren physiologischen Eigenschaften etabliert werden. Daigneault et al. verglichen so THP-1-Makrophagen verschiedener Differenzierungsprotokolle, z. B. hinsichtlich ihrer Zellkern-Zellplasma-Relation, intrazellulären Lysosom- und Mitochondrien-Konzentration sowie des basalen Zytokin-Expressionsmusters und der Resistenz gegenüber UV-strahlungsinduzierter Apoptose<sup>90</sup>. Das Differenzierungsprotokoll konnte durch Etablierung eines fünftägigen Inkubationsintervalls in PMA-freiem Medium so angepasst werden, dass THP-1-Makrophagen sich hinsichtlich ihrer physiologischen Eigenschaften MDM (*monocyte derived macrophages*) annäherten. Dies betont die Bedeutung einer kontrollierten Zelldifferenzierung unter Abgleichung zentraler physiologischer Eigenschaften der THP-1-Makrophagen mit denen von primären Zellen.

Wie bereits dargelegt, ist mit der Verwendung von biochemisch-heterogenen LPS verschiedener Chargen eine uneinheitliche, pro-inflammatorische Potenz verbunden, die eine interexperimentelle Vergleichbarkeit in der Arbeit mit THP-1-Makrophagen zusätzlich erschwert<sup>86</sup>. Daher sollten, soweit möglich, besondere Maßnahmen zur Gewährleistung der Reinheit und homogenen Zusammensetzung der genutzten LPS getroffen werden. Weiterhin sollten, wenn möglich, alle Experimente einer Studie mit einer einzigen LPS-Charge durchgeführt werden. Bei Hinweis auf eine LPS-abhängige Reduktion der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression im

Rahmen dieser Arbeit ist jedoch auch ein Wechsel des entzündlichen Stimulus zur Evaluierung AT<sub>2</sub>-Rezeptor-abhängiger Effekte zu erwägen. Hierfür käme z. B. TNF- $\alpha$  in Frage<sup>67</sup>.

Schließlich sollte die Nutzung von PD123319 zum Nachweis AT<sub>2</sub>-Rezeptor-abhängiger Effekte kritisch hinterfragt werden, da die Substanz als partieller Agonist des AT<sub>2</sub>-Rezeptors gilt und Interaktionen mit weiteren Rezeptoren wie dem Alamandine- und Mas-Rezeptor beschrieben worden sind<sup>80,81</sup>. Unter Berücksichtigung der mangelnden Etablierung neuer AT<sub>2</sub>-Antagonisten wie z. B. C38/M132 sollten gegebenenfalls weitere Methoden zur Sicherstellung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Spezifität beobachteter Effekte im THP-1-Assay hinzugezogen werden.

## 5 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund einer steigenden Inzidenz neurologischer Erkrankungen in den alternden Gesellschaften der großen Industrienationen kommt der Erschließung neuer und effektiver Behandlungsstrategien eine immer größere medizinisch-ethische, aber auch gesundheitsökonomische Bedeutung zu. Dies erfordert die Identifizierung neuer molekularbiologischer Angriffspunkte zur Entwicklung neuartiger Pharmazeutika. Seit der Entdeckung des AT<sub>2</sub>-Rezeptors hat sich unser Verständnis vom Renin-Angiotensin-Aldosteron-System kontinuierlich erweitert. So deutet Evidenz aus tierexperimentellen Studien auf eine neuroprotektive Rolle des AT<sub>2</sub>-Rezeptors im Rahmen zerebraler bzw. neurovaskulärer Erkrankungen hin. Die anti-entzündlichen, anti-apoptotischen und neurotrophischen Effekte der pharmakologischen AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation konnten bereits in verschiedenen Tiermodellen neurodegenerativer bzw. chronisch-entzündlicher Erkrankungen des ZNS sowie in Modellen des ischämischen Hirninfarkts und traumatischer Läsionen des ZNS bzw. PNS genutzt werden. Da bislang alle verfügbaren AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten nicht in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, wird die Entwicklung neuer ZNS-gängiger AT<sub>2</sub>-Agonisten vorangetrieben. Neue Substanzen werden so durch chemische Alteration AT<sub>2</sub>-agonistischer Ausgangsmoleküle synthetisiert und müssen konsekutiv erneut auf ihre intrinsische Aktivität am AT<sub>2</sub>-Rezeptor geprüft werden. Die Etablierung eines methodisch einfachen, reproduzierbaren Assays zur Bestimmung der intrinsischen Aktivität neuer ZNS-gängiger Moleküle mit Affinität am AT<sub>2</sub>-Rezeptor war Ziel dieser Arbeit.

Zu diesem Zweck wurde ein bereits in primären Zellen erprobtes Assay auf die monozytäre Zelllinie THP-1 übertragen. Dafür wurden zunächst der Einfluss der PMA-Differenzierung sowie die Effekte der Stimulation durch den etablierten AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten C21 auf die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression der THP-1-Zellen untersucht: Die PMA-abhängige Differenzierung von THP-1-Monozyten zu Makrophagen führte zu einer zehnfachen Steigerung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Expression im Western Blot ( $p = 0,0002$ ). Somit konnten die Vorteile der PMA-abhängigen Differenzierung zur Detektion AT<sub>2</sub>-Rezeptor-abhängiger Effekte in THP-1-Zellen bestätigt werden. Allerdings war nach Stimulation der differenzierten THP-1-Makrophagen durch  $1 \mu\text{mol/l}$  des AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten C21 für sechs Stunden eine Absenkung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression um etwa 80% im Vergleich zu unstimulierten THP-1-Makrophagen ( $p = 0,0001$ ) festzustellen. Anschließend wurden die neuen ZNS-gängigen Pharmazeutika JS5090, L162-389 und VR0008 hinsichtlich potentieller, AT<sub>2</sub>-agonistischer Effekte getestet. Dafür wurde angenommen, dass ein AT<sub>2</sub>-Agonist die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expressionssteigerung in THP-1-Makrophagen abschwächt. Die AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Spezifität sollte dabei durch Blockade beobachteter Effekte durch den AT<sub>2</sub>-Antagonisten PD123319 sichergestellt werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen des THP-1-Assays keine Evidenz für einen AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonismus der Substanzen JS5090, L162-389 und VR0008 gewonnen werden. Die Interpretation der vorliegenden Daten in dieser Hinsicht ist allerdings nicht möglich, da die Validierung des Assays mit dem etablierten AT<sub>2</sub>-Agonisten C21 nicht erfolgreich war, weil eine signifikante Absenkung der LPS-induzierten IL-6-mRNA-Expression durch C21 nicht zuverlässig und reproduzierbar nachgewiesen werden konnte. Angesichts der Fragilität des Assays gegenüber

methodischen Alterationen und dessen hoher interexperimenteller Variabilität selbst bei nahezu identischen Versuchsprotokollen, ist das IL-6-THP-1-Assay als Hochdurchsatz-Screening-Verfahren potentieller AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten ungeeignet. Die bestehende wissenschaftliche Literatur zur experimentellen Arbeit mit THP-1-Makrophagen offenbart zudem die methodische Heterogenität der genutzten Differenzierungs- und Stimulationsprotokolle. Um die Reproduzierbarkeit von AT<sub>2</sub>-Rezeptor-bezogenen Forschungsergebnissen in der Arbeit mit THP-1-Zellen zu verbessern, sollten Maßnahmen zur genaueren Charakterisierung von THP-1-Makrophagen nach Differenzierung etabliert werden. Zudem ist die Nutzung von LPS als inflammatorischer Stimulus problematisch, da die heterogene, biochemische Zusammensetzung der LPS mit einer uneinheitlichen, pro-inflammatorischen Potenz verbunden ist. Bei Hinweisen auf eine LPS-abhängige Senkung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein-Expression im Rahmen dieser Arbeit ist ein Wechsel des entzündlichen Stimulus zur Evaluierung AT<sub>2</sub>-Rezeptor-abhängiger Effekte zu erwägen. Schließlich sollten wegen der partiell agonistischen Eigenschaften und der fraglichen AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Selektivität des AT<sub>2</sub>-Antagonisten PD123319 die Etablierung neuer AT<sub>2</sub>-Antagonisten wie z. B. C38/M132 bzw. anderer Methoden zur Sicherstellung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Spezifität beobachteter Effekte angestrebt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochemical and biophysical research communications* 1989;163:284-91.
2. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochemical and biophysical research communications* 1989;165:196-203.
3. Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood pressure* 2003;12:70-88.
4. De Mello WC. Novel aspects of angiotensin II action in the heart. Implications to myocardial ischemia and heart failure. *Regulatory peptides* 2011;166:9-14.
5. Steckelings UM, Paulis L, Unger T, Bader M. Emerging drugs which target the renin-angiotensin-aldosterone system. *Expert opinion on emerging drugs* 2011;16:619-30.
6. Steckelings UM, Rompe F, Kaschina E, Unger T. The evolving story of the RAAS in hypertension, diabetes and CV disease: moving from macrovascular to microvascular targets. *Fundamental & clinical pharmacology* 2009;23:693-703.
7. Chang Y, Wei W. Angiotensin II in inflammation, immunity and rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental immunology* 2015;179:137-45.
8. Lastra-Lastra G, Sowers JR, Restrepo-Erazo K, Manrique-Acevedo C, Lastra-Gonzalez G. Role of aldosterone and angiotensin II in insulin resistance: an update. *Clinical endocrinology* 2009;71:1-6.
9. Saavedra JM. Angiotensin II AT(1) receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. *Clinical science* 2012;123:567-90.
10. Moreira de Macedo S, Guimaraes TA, Feltenberger JD, Sousa Santos SH. The role of renin-angiotensin system modulation on treatment and prevention of liver diseases. *Peptides* 2014;62:189-96.
11. Ruster C, Wolf G. Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2011;22:1189-99.
12. Steckelings UM, Paulis L, Namsolleck P, Unger T. AT2 receptor agonists: hypertension and beyond. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2012;21:142-6.
13. Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger T. The angiotensin II AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Molecular and cellular endocrinology* 1996;122:59-67.
14. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:10663-7.
15. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *The Journal of clinical investigation* 1995;95:651-7.
16. Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Yamada T, Dzau VJ. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:19022-6.
17. Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life sciences* 1998;63:PL289-95.
18. Gallinat S, Busche S, Schutze S, Kronke M, Unger T. AT2 receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells. *FEBS letters* 1999;443:75-9.

19. Leung KK, Liang J, Ma MT, Leung PS. Angiotensin II type 2 receptor is critical for the development of human fetal pancreatic progenitor cells into islet-like cell clusters and their potential for transplantation. *Stem cells* 2012;30:525-36.
20. Yamada H, Akishita M, Ito M, Tamura K, Daviet L, Lehtonen JY, Dzau VJ, Horiuchi M. AT2 receptor and vascular smooth muscle cell differentiation in vascular development. *Hypertension* 1999;33:1414-9.
21. Wu L, Iwai M, Li Z, Shiuchi T, Min LJ, Cui TX, Li JM, Okumura M, Nahmias C, Horiuchi M. 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. *Molecular endocrinology* 2004;18:666-78.
22. Rompe F, Artuc M, Hallberg A, Alterman M, Stroder K, Thone-Reineke C, Reichenbach A, Schacherl J, Dahlof B, Bader M, Alenina N, Schwaninger M, Zuberbier T, Funke-Kaiser H, Schmidt C, Schunck WH, Unger T, Steckelings UM. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension* 2010;55:924-31.
23. Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Iwai M, Horiuchi M, Chayama K. Anti-fibrogenic function of angiotensin II type 2 receptor in CCl4-induced liver fibrosis. *Biochemical and biophysical research communications* 2006;346:658-64.
24. Ulmasov B, Xu Z, Tetri LH, Inagami T, Neuschwander-Tetri BA. Protective role of angiotensin II type 2 receptor signaling in a mouse model of pancreatic fibrosis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2009;296:G284-94.
25. Gelosa P, Pignieri A, Fandriks L, de Gasparo M, Hallberg A, Banfi C, Castiglioni L, Turolo L, Guerrini U, Tremoli E, Sironi L. Stimulation of AT2 receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: focus on renal damage. *Journal of hypertension* 2009;27:2444-51.
26. Lauer D, Slavic S, Sommerfeld M, Thone-Reineke C, Sharkovska Y, Hallberg A, Dahlof B, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM, Kaschina E. Angiotensin type 2 receptor stimulation ameliorates left ventricular fibrosis and dysfunction via regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1/matrix metalloproteinase 9 axis and transforming growth factor beta1 in the rat heart. *Hypertension* 2014;63:e60-7.
27. Danyel LA, Schmerler P, Paulis L, Unger T, Steckelings UM. Impact of AT2-receptor stimulation on vascular biology, kidney function, and blood pressure. *Integrated blood pressure control* 2013;6:153-61.
28. Unger T, Steckelings U, Dos Santos R. *The Protective Arm of the Renin–Angiotensin System*. 1st ed: Academic Press, Elsevier; 2015.
29. Bader M, Santos RA, Unger T, Steckelings UM. New therapeutic pathways in the RAS. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 2012;13:505-8.
30. Wagenaar GT, Laghmani el H, Fidler M, Sengers RM, de Visser YP, de Vries L, Rink R, Roks AJ, Folkerts G, Walther FJ. Agonists of MAS oncogene and angiotensin II type 2 receptors attenuate cardiopulmonary disease in rats with neonatal hyperoxia-induced lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2013;305:L341-51.
31. Magnani F, Pappas CG, Crook T, Magafa V, Cordopatis P, Ishiguro S, Ohta N, Selent J, Bosnyak S, Jones ES, Gerothanassis IP, Tamura M, Widdop RE, Tzakos AG. Electronic sculpting of ligand-GPCR subtype selectivity: the case of angiotensin II. *ACS chemical biology* 2014;9:1420-5.
32. Yamada Y, Yamauchi D, Usui H, Zhao H, Yokoo M, Ohinata K, Iwai M, Horiuchi M, Yoshikawa M. Hypotensive activity of novokin, a potent analogue of ovokin(2-7), is mediated by angiotensin AT(2) receptor and prostaglandin IP receptor. *Peptides* 2008;29:412-8.

33. Yamada Y, Yamauchi D, Yokoo M, Ohinata K, Usui H, Yoshikawa M. A potent hypotensive peptide, novokinin, induces relaxation by AT<sub>2</sub>- and IP-receptor-dependent mechanism in the mesenteric artery from SHR. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2008;72:257-9.
34. Jones ES, Del Borgo MP, Kirsch JF, Clayton D, Bosnyak S, Welungoda I, Hausler N, Unabia S, Perlmutter P, Thomas WG, Aguilar MI, Widdop RE. A single beta-amino acid substitution to angiotensin II confers AT<sub>2</sub> receptor selectivity and vascular function. *Hypertension* 2011;57:570-6.
35. Steckelings UM, Rompe F, Kaschina E, Namsolleck P, Grzesiak A, Funke-Kaiser H, Bader M, Unger T. The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 2010;11:67-73.
36. Wan Y, Wallinder C, Plouffe B, Beaudry H, Mahalingam AK, Wu X, Johansson B, Holm M, Botoros M, Karlen A, Pettersson A, Nyberg F, Fandriks L, Gallo-Payet N, Hallberg A, Alterman M. Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT<sub>2</sub> receptor agonist. *Journal of medicinal chemistry* 2004;47:5995-6008.
37. Joseph JP, Mecca AP, Regenhardt RW, Bennion DM, Rodriguez V, Desland F, Patel NA, Pioquinto DJ, Unger T, Katovich MJ, Steckelings UM, Sumners C. The angiotensin type 2 receptor agonist Compound 21 elicits cerebroprotection in endothelin-1 induced ischemic stroke. *Neuropharmacology* 2014;81:134-41.
38. Lee S, Brait VH, Arumugam TV, Evans MA, Kim HA, Widdop RE, Drummond GR, Sobey CG, Jones ES. Neuroprotective effect of an angiotensin receptor type 2 agonist following cerebral ischemia in vitro and in vivo. *Experimental & translational stroke medicine* 2012;4:16.
39. McCarthy CA, Vinh A, Callaway JK, Widdop RE. Angiotensin AT<sub>2</sub> receptor stimulation causes neuroprotection in a conscious rat model of stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2009;40:1482-9.
40. McCarthy CA, Vinh A, Broughton BR, Sobey CG, Callaway JK, Widdop RE. Angiotensin II type 2 receptor stimulation initiated after stroke causes neuroprotection in conscious rats. *Hypertension* 2012;60:1531-7.
41. McCarthy CA, Vinh A, Miller AA, Hallberg A, Alterman M, Callaway JK, Widdop RE. Direct angiotensin AT<sub>2</sub> receptor stimulation using a novel AT<sub>2</sub> receptor agonist, compound 21, evokes neuroprotection in conscious hypertensive rats. *PloS one* 2014;9:e95762.
42. Min LJ, Mogi M, Tsukuda K, Jing F, Ohshima K, Nakaoka H, Kan-No H, Wang XL, Chisaka T, Bai HY, Iwanami J, Horiuchi M. Direct stimulation of angiotensin II type 2 receptor initiated after stroke ameliorates ischemic brain damage. *American journal of hypertension* 2014;27:1036-44.
43. Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen T, Sievers J, Unger T. The angiotensin II type 2 (AT<sub>2</sub>) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *The Journal of experimental medicine* 1998;188:661-70.
44. Namsolleck P, Boato F, Schwengel K, Paulis L, Matho KS, Geurts N, Thone-Reinecke C, Lucht K, Seidel K, Hallberg A, Dahlof B, Unger T, Hendrix S, Steckelings UM. AT<sub>2</sub>-receptor stimulation enhances axonal plasticity after spinal cord injury by upregulating BDNF expression. *Neurobiology of disease* 2013;51:177-91.
45. Reinecke K, Lucius R, Reinecke A, Rickert U, Herdegen T, Unger T. Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT<sub>2</sub> receptor and the transcription factor NF-kappaB. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003;17:2094-6.
46. Umschweif G, Liraz-Zaltsman S, Shabashov D, Alexandrovich A, Trembovler V, Horowitz M, Shohami E. Angiotensin receptor type 2 activation induces neuroprotection and neurogenesis after traumatic brain injury. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2014;11:665-78.

47. Umschweif G, Shabashov D, Alexandrovich AG, Trembovler V, Horowitz M, Shohami E. Neuroprotection after traumatic brain injury in heat-acclimated mice involves induced neurogenesis and activation of angiotensin receptor type 2 signaling. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2014;34:1381-90.
48. Maul B, von Bohlen und Halbach O, Becker A, Sterner-Kock A, Voigt JP, Siems WE, Grecksch G, Walther T. Impaired spatial memory and altered dendritic spine morphology in angiotensin II type 2 receptor-deficient mice. *Journal of molecular medicine* 2008;86:563-71.
49. Jing F, Mogi M, Sakata A, Iwanami J, Tsukuda K, Ohshima K, Min LJ, Steckelings UM, Unger T, Dahlof B, Horiuchi M. Direct stimulation of angiotensin II type 2 receptor enhances spatial memory. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2012;32:248-55.
50. Fuchtemeier M, Brinckmann MP, Foddiss M, Kunz A, Po C, Curato C, Dirnagl U, Farr TD. Vascular change and opposing effects of the angiotensin type 2 receptor in a mouse model of vascular cognitive impairment. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2015;35:476-84.
51. Valero-Esquitino V, Lucht K, Namsolleck P, Monnet-Tschudi F, Stubbe T, Lucht F, Liu M, Ebner F, Brandt C, Danyel LA, Villela DC, Paulis L, Thoene-Reineke C, Dahlof B, Hallberg A, Unger T, Sumners C, Steckelings UM. Direct angiotensin type 2 receptor (AT2R) stimulation attenuates T-cell and microglia activation and prevents demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Clinical science* 2015;128:95-109.
52. Iwai M, Liu HW, Chen R, Ide A, Okamoto S, Hata R, Sakanaka M, Shiuchi T, Horiuchi M. Possible inhibition of focal cerebral ischemia by angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Circulation* 2004;110:843-8.
53. Gallinat S, Yu M, Dorst A, Unger T, Herdegen T. Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of angiotensin AT2 and AT1 receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves. *Brain research Molecular brain research* 1998;57:111-22.
54. Bosnyak S, Welungoda IK, Hallberg A, Alterman M, Widdop RE, Jones ES. Stimulation of angiotensin AT2 receptors by the non-peptide agonist, Compound 21, evokes vasodepressor effects in conscious spontaneously hypertensive rats. *British journal of pharmacology* 2010;159:709-16.
55. Henrion D, Kubis N, Levy BI. Physiological and pathophysiological functions of the AT(2) subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation. *Hypertension* 2001;38:1150-7.
56. Vincent JM, Kwan YW, Chan SL, Perrin-Sarrado C, Atkinson J, Chillon JM. Constrictor and dilator effects of angiotensin II on cerebral arterioles. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2005;36:2691-5.
57. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2001;21:2-14.
58. Li J, Culman J, Hortnagl H, Zhao Y, Gerova N, Timm M, Blume A, Zimmermann M, Seidel K, Dirnagl U, Unger T. Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2005;19:617-9.
59. Stroth U, Meffert S, Gallinat S, Unger T. Angiotensin II and NGF differentially influence microtubule proteins in PC12W cells: role of the AT2 receptor. *Brain research Molecular brain research* 1998;53:187-95.
60. Shraim N, Mertens B, Clinckers R, Sarre S, Michotte Y, Van Eeckhaut A. Microbore liquid chromatography with UV detection to study the in vivo passage of compound 21, a non-

- peptidergic AT(2) receptor agonist, to the striatum in rats. *Journal of neuroscience methods* 2011;202:137-42.
61. Wu X, Wan Y, Mahalingam AK, Murugaiah AM, Plouffe B, Botros M, Karlen A, Hallberg M, Gallo-Payet N, Alterman M. Selective angiotensin II AT2 receptor agonists: arylbenzylimidazole structure-activity relationships. *Journal of medicinal chemistry* 2006;49:7160-8.
  62. Murugaiah AM, Wallinder C, Mahalingam AK, Wu X, Wan Y, Plouffe B, Botros M, Karlen A, Hallberg M, Gallo-Payet N, Alterman M. Selective angiotensin II AT(2) receptor agonists devoid of the imidazole ring system. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2007;15:7166-83.
  63. Wallinder C, Botros M, Rosenstrom U, Guimond MO, Beaudry H, Nyberg F, Gallo-Payet N, Hallberg A, Alterman M. Selective angiotensin II AT2 receptor agonists: Benzamide structure-activity relationships. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2008;16:6841-9.
  64. Mahalingam AK, Wan Y, Murugaiah AM, Wallinder C, Wu X, Plouffe B, Botros M, Nyberg F, Hallberg A, Gallo-Payet N, Alterman M. Selective angiotensin II AT(2) receptor agonists with reduced CYP 450 inhibition. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2010;18:4570-90.
  65. Wardat S. *Metabolische Wirkungen des ersten nicht-peptidischen Angiotensin II Rezeptor Typ 2 Agonisten*. Berlin: Freie Universität Berlin; 2011.
  66. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer Journal international du cancer* 1980;26:171-6.
  67. Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, Yanagitani Y, Takiuchi S, Moriguchi K, Fennessy PA, Higaki J, Ogihara T. Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *Journal of hypertension* 1999;17:537-45.
  68. Chanput W, Mes J, Vreeburg RA, Savelkoul HF, Wichers HJ. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food & function* 2010;1:254-61.
  69. Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RM. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 1966;5:467-77.
  70. Busse O. *Strukturdaten Neurologie 2009/2010: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN); September 2009*.
  71. Prilipko L. *Atlas: Country resources for neurological disorders*. Geneva: Collaborative study of the World Health Organization and the World Federation of Neurology; 2004.
  72. Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J Immunol Methods* 2016;430:64-70.
  73. Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 2007;56:45-50.
  74. Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol* 1996;59:555-61.
  75. Hafko R, Villapol S, Nostramo R, Symes A, Sabban EL, Inagami T, Saavedra JM. Commercially available angiotensin II At(2) receptor antibodies are nonspecific. *PloS one* 2013;8:e69234.
  76. Menk M, Graw JA, von Haefen C, Sifringer M, Schwaiberger D, Unger T, Steckelings U, Spies CD. Stimulation of the Angiotensin II AT2 Receptor is Anti-inflammatory in Human Lipopolysaccharide-Activated Monocytic Cells. *Inflammation* 2015;38:1690-9.
  77. Miura S, Karnik SS, Saku K. Constitutively active homo-oligomeric angiotensin II type 2 receptor induces cell signaling independent of receptor conformation and ligand stimulation. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:18237-44.

78. Bosnyak S, Jones ES, Christopoulos A, Aguilar MI, Thomas WG, Widdop RE. Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clinical science* 2011;121:297-303.
79. Wagenaar GT, Sengers RM, Laghmani el H, Chen X, Lindeboom MP, Roks AJ, Folkerts G, Walther FJ. Angiotensin II type 2 receptor ligand PD123319 attenuates hyperoxia-induced lung and heart injury at a low dose in newborn rats. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2014;307:L261-72.
80. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, Jankowski J, Jankowski V, Sousa F, Alzamora A, Soares E, Barbosa C, Kjeldsen F, Oliveira A, Braga J, Savergnini S, Maia G, Peluso AB, Passos-Silva D, Ferreira A, Alves F, Martins A, Raizada M, Paula R, Motta-Santos D, Klempin F, Pimenta A, Alenina N, Sinisterra R, Bader M, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circulation research* 2013;112:1104-11.
81. Villela D, Leonhardt J, Patel N, Joseph J, Kirsch S, Hallberg A, Unger T, Bader M, Santos RA, Summers C, Steckelings UM. Angiotensin type 2 receptor (AT2R) and receptor Mas: a complex liaison. *Clinical science* 2015;128:227-34.
82. Daugherty A, Rateri DL, Howatt DA, Charnigo R, Cassis LA. PD123319 augments angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms through an AT2 receptor-independent mechanism. *PloS one* 2013;8:e61849.
83. Guimond MO, Wallinder C, Alterman M, Hallberg A, Gallo-Payet N. Comparative functional properties of two structurally similar selective nonpeptide drug-like ligands for the angiotensin II type-2 (AT(2)) receptor. Effects on neurite outgrowth in NG108-15 cells. *European journal of pharmacology* 2013;699:160-71.
84. Wallinder C, Skold C, Botros M, Guimond MO, Hallberg M, Gallo-Payet N, Karlen A, Alterman M. Interconversion of Functional Activity by Minor Structural Alterations in Nonpeptide AT2 Receptor Ligands. *ACS Med Chem Lett* 2015;6:178-82.
85. Maess MB, Wittig B, Cignarella A, Lorkowski S. Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *J Immunol Methods* 2014;402:76-81.
86. Gaekwad J, Zhang Y, Zhang W, Reeves J, Wolfert MA, Boons GJ. Differential induction of innate immune responses by synthetic lipid a derivatives. *The Journal of biological chemistry* 2010;285:29375-86.
87. Galanos C, Luderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, Brade L, Freudenberg M, Schade U, Imoto M, Yoshimura H. Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. *European journal of biochemistry / FEBS* 1985;148:1-5.
88. Mathiak G, Kabir K, Grass G, Keller H, Steinringer E, Minor T, Rangger C, Neville LF. Lipopolysaccharides from different bacterial sources elicit disparate cytokine responses in whole blood assays. *Int J Mol Med* 2003;11:41-4.
89. Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* 2012;221:2-11.
90. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS one* 2010;5:e8668.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Der AT <sub>1</sub> - und AT <sub>2</sub> -Rezeptor im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	9
Abb. 2:	Die protektive Achse des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.....	10
Abb. 3:	Chemische Struktur von C21.....	11
Abb. 4:	Struktur von Compound 21 als Ausgangspunkt für AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Agonisten .....	15
Abb. 5:	Lichtmikroskopische Aufnahme der THP-1-Zellen verschiedener Zelldichten....	25
Abb. 6 und 7:	Lichtmikroskopische Aufnahmen der THP-1-Zellen vor und nach Differenzierung mittels PMA.....	26
Abb. 8:	Beispielhafte Plattenbelegung der LPS-Stimulationsexperimente.....	29
Abb. 9:	Kinetik der qPCR.....	34
Abb. 10:	Beispielhafte Plattenbelegung der qPCR.....	36
Abb. 11:	Einfluss der THP-1-Zelldifferenzierung auf die AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Protein-Expression .....	40
Abb. 12:	Einfluss von AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Agonismus bzw. LPS-Stimulation auf die AT <sub>2</sub> -Rezeptor-Protein-Expression in THP-1-Makrophagen .....	41
Abb. 13:	Einfluss von LPS auf die IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen.....	42
Abb. 14:	Einfluss von C21 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen .....	44
Abb. 15:	Einfluss von VR0008 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen .....	45
Abb. 16:	Einfluss von JS5090 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen .....	46
Abb. 17:	Einfluss von L162-389 auf die LPS-induzierte IL-6-mRNA-Expression in THP-1-Makrophagen.....	47

---

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung der Stimulationsmedien .....	28
Tabelle 2:	Zubereitung der Stocklösungen .....	29
Tabelle 3:	Substanzen des NucleoSpin® RNA II-Kits.....	31
Tabelle 4:	Vorbereitung der Proben für die MOPS-Gelelektrophorese .....	32
Tabelle 5:	Zusammensetzung des RT-PCR-Mastermix .....	32
Tabelle 6:	Zusammensetzung des qPCR-Mastermix.....	35
Tabelle 7:	Primerverzeichnis .....	36
Tabelle 8:	Reaktionsschritte der qPCR.....	36
Tabelle 9:	Stimulationsgruppen der Western Blot-Experimente.....	37
Tabelle 10:	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels .....	38
Tabelle 11:	Übersicht zu den verwendeten Western Blot-Antikörpern.....	39
Tabelle 12:	Eckdaten der THP-1-Differenzierung und -Stimulation .....	53

## 9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Leon Alexander Danyel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der intrinsischen Aktivität potentieller AT<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten in differenzierten THP-1-Makrophagen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE – www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

### Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Leon Alexander Danyel hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** Danyel, L. A., Schmerler, P., Paulis, L., Unger, T., Steckelings, U. M., Impact of AT<sub>2</sub>-receptor stimulation on vascular biology, kidney function, and blood pressure, Integrated Blood Pressure Control, 2013

Beitrag im Einzelnen: Review; Beschreibung der Rolle des AT<sub>2</sub>-Rezeptors in der Nierenphysiologie und Pathophysiologie renaler Erkrankungen

**Publikation 2:** Valero-Esquitino, V., Lucht, K., Namsolleck, P., Monnet-Tschudi, F., Stubbe, T., Lucht, F., Liu, M., Ebner, F., Brandt, C., Danyel, L. A., Villela, D. C., Paulis, L., Thoene-Reineke, C., Dahlof, B., Hallberg, A., Unger, T., Sumners, C., Steckelings, U. M., Direct angiotensin type 2 receptor (AT<sub>2</sub>R) stimulation attenuates T-cell and microglia activation and prevents demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice, Clinical Science (London), 2015

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von LPS-Stimulationsexperimenten mit Mikroglia-Zellen

**Publikation 3 (in Vorbereitung):** Wardat, S., Benz, V., Winkler, R., Schwanstecher, A., Danyel, L. A., Witte, N., Schupp, M., Paulis, L., Iwai, M., Horiuchi, M., Hallberg, A., Dahlöf, B., Unger, T., Kintscher, U., Steckelings, U. M., Foryst-Ludwig, A., Direct angiotensin II type 2 receptor (AT2R) stimulation reduces adipose tissue-derived inflammation and improves obesity-related metabolic outcome in-vivo, (voraussichtlich) 2017

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von Stimulationsexperimenten mit THP-1-Makrophagen unter Nutzung von Palmitinsäure; Untersuchung des Einflusses der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Stimulation auf Palmitinsäure-induzierte Zytokine

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrer

Unterschrift des Doktoranden

## **10 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

**Publikationsliste**

**Publikation 1:** Danyel, L. A., Schmerler, P., Paulis, L., Unger, T., Steckelings, U. M., Impact of AT2-receptor stimulation on vascular biology, kidney function, and blood pressure, Integrated Blood Pressure Control, 2013

**Publikation 2:** Valero-Esquitino, V., Lucht, K., Namsolleck, P., Monnet-Tschudi, F., Stubbe, T., Lucht, F., Liu, M., Ebner, F., Brandt, C., Danyel, L. A., Villela, D. C., Paulis, L., Thoene-Reineke, C., Dahlof, B., Hallberg, A., Unger, T., Summers, C., Steckelings, U. M., Direct angiotensin type 2 receptor (AT2R) stimulation attenuates T-cell and microglia activation and prevents demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice, Clinical Science (London), 2015

**Publikation 3 (in Vorbereitung):** Wardat, S., Benz, V., Winkler, R., Schwanstecher, A., Danyel, L. A., Witte, N., Schupp, M., Paulis, L., Iwai, M., Horiuchi, M., Hallberg, A., Dahlöf, B., Unger, T., Kintscher, U., Steckelings, U. M., Foryst-Ludwig, A., Direct angiotensin II type 2 receptor (AT2R) stimulation reduces adipose tissue-derived inflammation and improves obesity-related metabolic outcome in-vivo, (voraussichtlich) 2017

## 11 Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Univ.- Prof. Dr. med. U. M. Steckelings für die herzliche Betreuung meiner Dissertation, das beständige Vertrauen in meine Forschungsarbeit und die großzügige Bereitstellung der dafür notwendigen Ressourcen bedanken. Ich danke auch Prof. Dr. med. Ralf Stahlmann, der durch seine bereitwillige Übernahme der Betreuung meiner Dissertation einen erfolgreichen Abschluss dieser ermöglicht hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt den ehemaligen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe Steckelings im Center for Cardiovascular Research der Charité (CCR): Kristin Lucht, Sebastian Kirsch, Maibritt Mardahl, Patrick Schmerler und Veronica Valero Esquitino. Ohne Eure geduldige Einarbeitung, hilfreichen Ratschläge zur Verbesserung der experimentellen Methodik und stetige, konstruktive Kritik wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen.

Für die freundliche Zusammenarbeit und die Möglichkeit der Beteiligung an interessanten Kooperationsprojekten möchte ich mich auch bei der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. med. U. Kintscher sowie der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. med. E. Kaschina des CCR bedanken.

Miriam Scholz möchte ich für ihre gründliche grammatikalische und orthographische Zweitprüfung der Dissertationsarbeit im Rahmen ihrer Tätigkeit als Korrektorin danken.

Auch danke ich Dr. Waław Brachaczek für die abendlichen und immer sehr aufschlussreichen Diskussionen über die Eigenheiten des akademischen Betriebs.

Schließlich gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meiner Frau Magdalena Danyel und meinen Eltern, die mich mit ihrer ungebrochenen Unterstützung stets in meiner akademischen Arbeit bestärkt haben.