

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

DISSERTATION

Untersuchungen zur funktionellen Interaktion zwischen dem  
Rezeptor Mas und dem AT2-Rezeptor  
in primären, murinen Astrozyten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Leonhardt

aus Bad Schlema

Datum der Promotion: 27.02.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungs- und Symbolverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
1.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache	1
1.2 Abstract	2
<b>2 Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1 Das Renin-Angiotensin-System (RAS)	4
2.2 Der Rezeptor Mas (MasR)	6
2.3 Der Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (AT2R)	7
2.4 Hinweise auf Interaktionen zwischen AT2R und MasR – „Das PD-Phänomen“	9
2.5 Zielsetzung der Arbeit	12
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>13</b>
3.1 Verwendete Materialien	13
3.2 Zellbiologische Methoden	17
3.3 RNA-Isolierung	22
3.4 cDNA-Synthese	22
3.5 Quantitative real-time PCR	24
3.6 Graphische Darstellungen	30
3.7 Statistische Auswertung	30
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>31</b>
4.1 CX3CR1-mRNA-Expression nach Rezeptorstimulation in Astrozyten	31
4.2 Wirkung und Rezeptorspezifität der verwendeten Substanzen	37
4.3 Experimente zur Interaktion von MasR und AT2R	46

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
5.1	Identifizierung von funktioneller Interaktion zwischen AT2R und MasR in primären, murinen Astrozyten	56
5.2	CX3CR1-mRNA-Expression in Astrozyten	57
5.3	Wirkung und Rezeptorspezifität der verwendeten Substanzen	62
5.4	Experimente zur Interaktion von MasR und AT2R	64
5.5	Mögliche Ursachen von funktioneller Interaktion und fehlendem additiven Synergismus	67
5.6	Medizinische und biologische Bedeutung von funktioneller Interaktion und Dimerisierung von MasR und AT2R	70
5.7	Funktionelle Interaktionen und Dimerisierungen im Renin-Angiotensin-System	71
5.8	Limitationen der vorliegenden Arbeit und Ausblick	71
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>96</b>

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

*	signifikanter Unterschied, $p < 0,05$
**	sehr signifikanter Unterschied, $p < 0,01$
***	hoch signifikanter Unterschied, $p < 0,001$
-/-	Knockout
_as	<i>antisense</i> Primer
_s	<i>sense</i> Primer
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
18S	ribosomale Ribonukleinsäure 18S
A-779	der selektive Mas-Rezeptor-Antagonist (D-Ala <sup>7</sup> )-Angiotensin-(1-7)
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (engl. <i>Angiotensin-converting enzyme</i> )
ACE1	Angiotensin-konvertierendes Enzym 1 (engl. <i>Angiotensin-converting enzyme 1</i> )
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (engl. <i>Angiotensin-converting enzyme 2</i> )
AG	Arbeitsgruppe
Ang-(1-7)	der selektive Mas-Rezeptor-Agonist Angiotensin-(1-7)
AT1R	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
AT1-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
AT2-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2
AT2R	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2
AT2R <sup>-/-</sup>	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 Knockout
AT2R-KO	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 Knockout
AVE0991	der selektive MasR-Agonist AVE0991
Bcl-2	das Apoptoseregulationsprotein <i>B-cell lymphoma 2- pro-</i>

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

---

	<i>tein</i>
BDNF	das Neurotrophin <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bp	Basenpaar, Längeneinheit für Nukleinsäuren
C21	der selektive AT2-Rezeptor-Agonist <i>Compound 21</i>
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CT	Schwellenwertzyklus (engl. <i>threshold cycle</i> )
CX3CR1	der Chemokinrezeptor <i>CX3C receptor 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäuren (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
ERK1/2	die Kinase <i>extracellular-signal-regulated kinase 1 or 2</i>
et al.	und andere (lat. <i>et alii</i> )
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
G	Gauge
GAPDH	das Glykolyseenzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GFAP	saures Gliafaserprotein (engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
HKG	<i>Housekeeping</i> -Gen
HPRT	das Purinstoffwechsellenzym Hypoxanthin-

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

---

	Phosphoribosyl-Transferase
KO	Knockout
lat.	lateinisch
log	Logarithmus zur Basis 10
MasR	der Rezeptor Mas
MasR <sup>-/-</sup>	Knockout des Rezeptors Mas
MasR-KO	Knockout des Rezeptors Mas
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n.s.	nicht signifikant
NF-κB	der Transkriptionsfaktor <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
<i>NNTI</i>	<i>N-naphthoyl-beta-naltrexamine</i>
NTRK2	der Rezeptor <i>neurotrophic tyrosine kinase receptor, type 2</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PD123177	der selektive AT2-Rezeptor-Antagonist PD123177
PD123319	der selektive AT2-Rezeptor-Antagonist PD123319
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
R	relative Genexpression
RAS	Renin-Angiotensin-System
rDNase	Rekombinante Desoxyribonuklease
RNA	Ribonukleinsäuren (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
RT-	Negativkontrolle, Probe ohne reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl. <i>standard error of</i>

	<i>mean</i> )
SHP-1	die Tyrosinkinase <i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1</i>
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheiten (engl. <i>Units</i> )
UK	Großbritannien (engl. <i>United Kingdom</i> )
UpM	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (engl. <i>United States of America</i> )
UV	ultraviolett
V	Volt
vs.	gegen (lat. <i>versus</i> )
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZG	Zielgen
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache

**Einleitung:** Sowohl der Rezeptor Mas (MasR) als auch der Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (AT2R) sind Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren. Beide Rezeptoren vermitteln ähnliche antiinflammatorische und vasodilatative Funktionen im Renin-Angiotensin-System. Verschiedene Studien berichten, dass Effekte, die durch den MasR hervorgerufen werden, durch Antagonisten des AT2R inhibiert werden. Dieses Phänomen konnte bislang nicht erklärt werden. Ziel dieser Arbeit war es, die möglichen Interaktionen beider Rezeptoren weiter zu untersuchen.

**Methodik:** Astrozytenprimärkulturen wurden aus neonatalen Wildtyp-, AT2R-Knockout- oder MasR-Knockout-Mäusen isoliert. Die Zellen wurden mit dem MasR-Agonisten Angiotensin-(1-7), dem AT2R-Agonisten *Compound 21* oder reinem Wasser inkubiert. Ein Teil der Astrozyten wurde zusätzlich mit dem AT2R-Antagonisten PD123319 oder dem MasR-Antagonisten A-779 vorinkubiert. Als Maß der Rezeptoraktivierung wurde die CX3CR1-mRNA-Expression mittels quantitativer *real-time* PCR bestimmt.

**Ergebnisse:** Sowohl die Stimulation des MasR mit Angiotensin-(1-7) als auch die Stimulation des AT2R mit *Compound 21* führten zu einer signifikanten Steigerung der CX3CR1-Expression. Diese Effekte waren aufgehoben, wenn der entsprechende Rezeptor antagonisiert wurde oder durch Knockout nicht funktionsfähig war. Eine Antagonisierung oder ein Knockout des jeweils anderen Rezeptors führte ebenso zur Aufhebung des Effektes. So bewirkte eine Antagonisierung bzw. ein Knockout des AT2R einen signifikanten Wirkungsverlust des MasR-Agonisten Angiotensin-(1-7).

**Schlussfolgerung:** Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass in primären, murinen Astrozyten eine funktionelle Interaktion der beiden Rezeptoren existiert. Dies wird zusätzlich durch neueste Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe unterstützt, wonach mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) eine Dimerisierung zwischen beiden Rezeptoren nachgewiesen wurde. Funktionelle Interaktionen von Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren können von essentieller Bedeutung sein für das Ver-



ständnis von Rezeptorwirkungen sowie die Pathogenese von Erkrankungen. Sie zeigen Ursachen von Arzneimittelwechselwirkungen auf und können als neue Ansatzpunkte zur Medikamentenentwicklung dienen.

### 1.2 Abstract

**Background:** The receptor Mas (MasR) and the AT2-receptor (AT2R) are seven-transmembrane domain receptors within the renin-angiotensin system. Both receptors mediate vasodilative and anti-inflammatory effects in a very similar way. Various studies report that effects of MasR agonists can be abolished by AT2R blockers. The cause of this phenomenon is still unknown. The aim of our study was to investigate putative interactions between MasR and AT2R.

**Design and Methods:** Astrocytes were isolated from neonatal wild type, AT2R<sup>-/-</sup> or MasR<sup>-/-</sup> mice and stimulated with the MasR agonist angiotensin-(1-7), the AT2R agonist Compound 21 or vehicle. Additionally, prestimulation with the AT2R blocker PD123319 or the MasR blocker A-779 was tested. CX3CR1 mRNA expression was used as a readout for receptor activation and measured by real-time PCR.

**Results:** Stimulation of either the AT2R by Compound 21 or the MasR by angiotensin-(1-7) significantly upregulated mRNA encoding the chemokine receptor CX3CR1. The effects of angiotensin-(1-7) or Compound 21 were completely absent when their respective receptor was either pharmacologically blocked or knocked out. Surprisingly, the effects of angiotensin-(1-7) and Compound 21 were also eliminated when the respective other receptor (e.g., AT2R in case of angiotensin-(1-7)) was blocked or non-functional.

**Conclusion:** Our results suggest that there is a close functional interaction between MasR and AT2R in primary mouse astrocytes. These results are supported by recent data from our group showing AT2R/MasR heterodimerization by Förster resonance energy transfer (FRET). Functional interactions of seven-transmembrane domain receptors are pivotal for the understanding of receptor functioning and the pathogenesis of

various diseases. They may give an explanation for drug interactions and provide new targets for drug development.

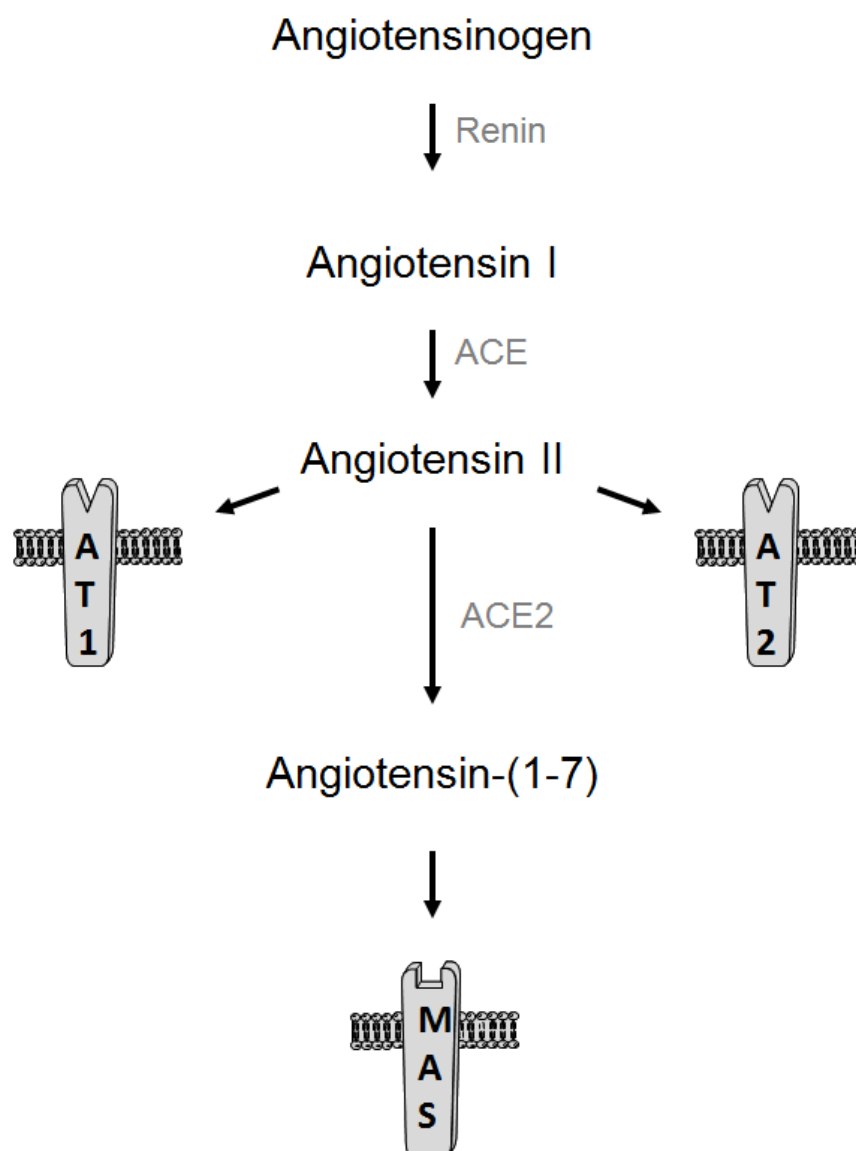
## 2 Einleitung

### 2.1 Das Renin-Angiotensin-System (RAS)

Die Erforschung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) geht bis auf das Jahr 1896 zurück, als Prof. Robert Tigerstedt und sein studentischer Assistent Per Bergman im schwedischen Karolinska-Institut mit ihren Experimenten zur Blutdruckregulation begannen. Sie zerrieben frische Kaninchennieren zusammen mit Glaspulver und physiologischer Kochsalzlösung. Die entstandene Flüssigkeit wurde filtriert und führte bei intravenöser Gabe binnen von Minuten zu einem deutlichen Blutdruckanstieg im gesunden Kaninchen. Sie schlussfolgerten, dass die Niere eine Substanz produzieren müsse, die zu diesem Blutdruckanstieg führte und nannten diese Substanz Renin.<sup>1</sup> Nach Beschreibung der beiden Angiotensin-II-Rezeptor-Subtypen,<sup>2-4</sup> knapp 100 Jahre nach Robert Tigerstedt, kann das Grundkonzept des RAS wie folgt zusammengefasst werden (siehe auch Abbildung 2.1):

Angiotensinogen, ein aus 452 Aminosäuren bestehendes Protein, wird vornehmlich von der Leber synthetisiert und ins Blut sezerniert. Dieses zirkulierende Prohormon kann durch das Enzym Renin in das zehn Aminosäuren lange Peptid Angiotensin I gespalten werden. Das Enzym Renin entstammt dabei, wie bereits von Tigerstedt beschrieben, aus der Niere und wird vom juxtaglomerulären Apparat bei verminderter Nierendurchblutung, vermindertem Salzgehalt des Primärharns oder Sympathikusaktivierung freigesetzt. Durch Abspaltung zweier Aminosäuren entsteht aus Angiotensin I das Oktapeptid Angiotensin II. Dieser Schritt wird durch das endothelständige, hauptsächlich im Kapillarsystem der Lunge vorkommende Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE oder auch ACE1) katalysiert.<sup>5-8</sup> Das entstehende Angiotensin II ist das maßgebliche Effektorhormon des RAS und entfaltet seine Wirkung hauptsächlich durch den Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 (AT1-Rezeptor, AT1R), welcher in zahlreichen kardiovaskulär wichtigen Geweben – wie der glatten Muskulatur des Gefäßsystems, dem Herzen, der Niere, der Nebennierenrinde und verschiedenen Regionen im zentralen Nervensystem (ZNS) – in großer Zahl exprimiert wird. Eine Stimulation des AT1R durch Angiotensin II führt zur Blutdrucksteigerung sowie zur Wasser- und Salzretention. Überdies wird die Freisetzung von Aldosteron, welches ebenfalls

die Salz- und Wasserretention fördert, über den AT1R reguliert. Ebenso werden inflammatorische Prozesse, kardiales *Remodelling* und die Proliferation vieler Zelltypen über den AT1-Rezeptor vermittelt, was pathophysiologisch eng mit der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert ist. Eine Bindung von Angiotensin II an den Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (AT2-Rezeptor, AT2R) scheint die Effekte des AT1R zu antagonisieren und somit einer Überstimulation des AT1R entgegenzuwirken. So wirkt eine Stimulation des AT2R antiinflammatorisch, antiproliferativ und kardioprotektiv.<sup>6-10</sup>



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems mit Angiotensin-(1-7), ACE2 und Rezeptor Mas.

Der AT2R galt lange Zeit als der einzige protektive Mechanismus im RAS, doch die Entdeckung des ACE-Homologs Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (ACE2) im Jahr 2000 erweiterte das Verständnis des klassischen RAS erheblich. So konnte gezeigt werden, dass ACE2 *in vivo* zur Abspaltung der C-Terminalen Aminosäure Phenylalanin von Angiotensin II führt. Somit wird das potentiell gefäßschädigende Peptid Angiotensin II in das vasoprotektive Angiotensin-(1-7) (kurz: Ang-(1-7)) umgewandelt. Ang-(1-7) vermittelt seine Effekte über den Rezeptor Mas.<sup>11,12</sup> Die vollständige wissenschaftliche Aufklärung der protektiven Anteile des RAS ist derzeit weltweit Gegenstand zahlreicher Forschungsaktivitäten. So gelten Ang-(1-7), ACE2, MasR und AT2R nicht nur als Zielstrukturen für potentielle neue Therapeutika,<sup>13</sup> sondern können auch maßgeblich an der Pathogenese von Erkrankungen beteiligt sein.<sup>14</sup>

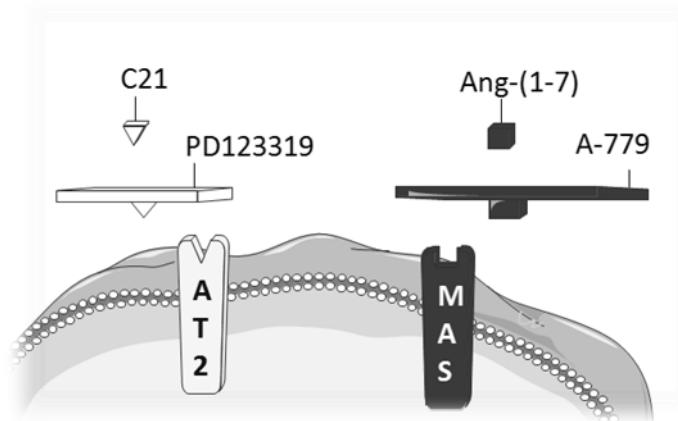
### 2.2 Der Rezeptor Mas (MasR)

Der Rezeptor Mas wurde erstmals 1986 beschrieben.<sup>15</sup> Er umfasst sieben Transmembrandomänen und gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.<sup>15,16</sup> Das Gen des MasR ist beim Menschen auf Chromosom 6 und bei der Maus auf Chromosom 17 lokalisiert und wird vor allem im zentralen Nervensystem exprimiert.<sup>17-19</sup>

Da sein natürlicher Ligand über viele Jahre unbekannt war, galt das wissenschaftliche Interesse am MasR zunächst eher seinen Eigenschaften als Protoonkogen.<sup>20</sup> Seine eigentliche Bedeutung für das Renin-Angiotensin-System als Angiotensin-(1-7)-Rezeptor wurde erst 2003 durch Santos und Mitarbeiter erschlossen.<sup>21</sup> Zusammen mit dem Enzym ACE2 und seinem Liganden Ang-(1-7) gehört der Rezeptor Mas zur protektiven Achse des RAS. Bei zahlreichen kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen wurden durch die Aktivierung dieser ACE2/Ang-(1-7)/MasR-Achse protektive Effekte nachgewiesen.<sup>8</sup> So kann eine pharmakologische Stimulation des Rezeptors Mas im Nagetier das *Outcome* nach einem Myokardinfarkt deutlich verbessern und durch Vasodilatation von Koronargefäßen neue Therapieoptionen bei der koronaren Herzkrankheit eröffnen.<sup>22-24</sup> In mehreren Tiermodellen und auch im menschlichen Organismus konnte eine Vasorelaxation und damit eine Senkung des Blutdrucks durch

Mas-Rezeptor-Agonisten nachgewiesen werden.<sup>25-27</sup> Auch scheint der Rezeptor Mas der Entstehung des metabolischen Syndroms entgegenzuwirken und eine Proteinurie, welche durch Diabetes mellitus oder arteriellen Bluthochdruck verursacht wird, deutlich abzumildern.<sup>25,28,29</sup> Hinsichtlich dieser Erkenntnisse wird der Rezeptor Mas zu einem viel versprechenden Gegenstand der kardiovaskulären Forschung.

Neben Angiotensin-(1-7), dem natürlichen Liganden des Rezeptors Mas, stehen artifizielle Agonisten und Antagonisten zur Verfügung.<sup>30-33</sup> Für die vorliegende Arbeit wurden zur Untersuchung des Rezeptors Mas sein natürlicher Agonist Ang-(1-7) und der Antagonist A-779 verwendet. Abbildung 2.2 zeigt eine Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Rezeptoragonisten und -antagonisten



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Agonisten und Antagonisten des Angiotensin-II-Rezeptors 2 (AT2R) und des Rezeptors Mas (MasR).

### 2.3 Der Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (AT2R)

Der Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (AT2-Rezeptor, AT2R) gehört wie der Rezeptor Mas zu den Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen.<sup>34,35</sup> Da er jedoch seine Hauptwirkungen nicht über die intrazellulären Signalkaskaden der bekannten G-Proteine vermittelt, wird er von vielen Autoren nicht zu den klassischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gezählt.<sup>36,37</sup> Sowohl bei Maus und Ratte als auch beim Menschen ist das Gen des AT2R auf dem langen Arm des X-Chromosoms lokalisiert.<sup>38-40</sup>

Bisherige Konzepte gingen davon aus, dass der AT2-Rezeptor vor allem in der Fetalzeit exprimiert wird und sich nach der Geburt das AT2R/AT1R-Verhältnis zugunsten des AT1R verschiebt.<sup>41-43</sup> Jüngste Studien deuten jedoch an, dass der AT2R in verschiedenen Geweben des adulten Organismus – darunter ZNS, Leber und Niere – zahlenmäßig häufiger vorkommt als der AT1R.<sup>44,45</sup> Überdies konnte gezeigt werden, dass der AT2R im Rahmen verschiedener Erkrankungen verstärkt exprimiert wird.<sup>46-50</sup> Im Tiermodell findet sich 24 Stunden nach Herzinfarkt im kardialen Gewebe eine mehr als 17-fach gesteigerte AT2R-Expression.<sup>46</sup> Auch 7 Tage nach Ischämie ist die AT2R-Expression noch deutlich erhöht, was sich am stärksten in den infarzierten Myokardarealen zeigt.<sup>47</sup> Auch Tiermodelle für den Schlaganfall zeigen krankheitsbedingt ein häufigeres Vorkommen des AT2R. So ist die Konzentration des AT2R 2 Tage nach Schlaganfall in den Hirnregionen der Penumbra mehr als verdoppelt.<sup>48</sup> Signifikant erhöhte AT2R-Expressionen wurden zudem im Tiermodell des Diabetes mellitus sowie nach Nierenschädigungen beobachtet.<sup>49,50</sup>

Der AT2R fungiert als natürlicher Gegenspieler des AT1R. Während eine Aktivierung des AT1R zu Vasokonstriktion und Zellproliferation führt, fördert der AT2R eher Vasodilatation und Apoptose.<sup>51</sup> Es wird davon ausgegangen, dass zumindest ein Teil der positiven Wirkungen von AT1-Rezeptor-Antagonisten wie Losartan oder Candesartan durch eine vermehrte Bindung von Angiotensin II an AT2-Rezeptoren zustande kommt.<sup>51</sup> Auch die direkte Stimulation des AT2R birgt ein hohes therapeutisches Potential. So führte die Gabe von AT2R-Agonisten nach einem Myokardinfarkt zu einer deutlich kleineren Myokardnarbe und einer verbesserten Herzfunktion.<sup>52-54</sup> Die Aktivierung des AT2R vermindert im Tiermodell zudem signifikant Arteriosklerose und arterielle Gefäßsteifigkeit.<sup>55-57</sup> Überdies wirkt der AT2R antiinflammatorisch und antifibrotisch.<sup>58-61</sup> Vasodilatative und damit blutdrucksenkende Eigenschaften des AT2R wurden von einigen Arbeitsgruppen beschrieben, gelten jedoch als umstritten und scheinen stark vom jeweiligen Organismus und äußeren Bedingungen abhängig zu sein.<sup>62</sup>

Die pharmakologische Stimulation des AT2R war über viele Jahre nur mit Limitationen möglich, da der natürliche Agonist Angiotensin II mit hoher Affinität am AT2R und am

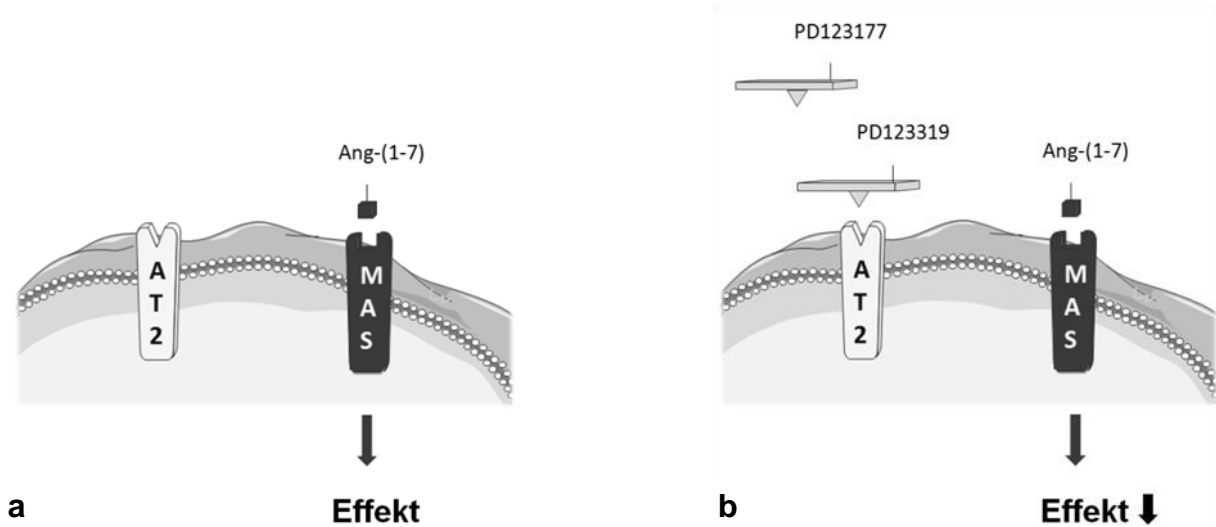
AT1R bindet.<sup>63</sup> Durch die Entwicklung des ersten selektiven nicht-peptidischen AT2R-Agonisten *Compound 21 (C21)* wurde die Erforschung des AT2R erheblich vereinfacht.<sup>64</sup> Zur Antagonisierung des AT2R stehen mehrere Substanzen zur Verfügung, unter anderem PD123177 oder PD123319. Für die vorliegende Arbeit wurde C21 als Agonist und PD123319 als potenter, selektiver und spezifischer Antagonist am AT2R verwendet (siehe auch Abbildung 2.2).<sup>65</sup>

### **2.4 Hinweise auf Interaktionen zwischen AT2R und MasR – „Das PD-Phänomen“**

Vor Entdeckung der Bedeutung des Rezeptors Mas als Ang-(1-7)-Rezeptor wurde vermutet, dass Angiotensin-(1-7) seine Wirkungen über den AT1R oder AT2R vermittelt.<sup>66,67</sup> Dies führte zu zahlreichen Studien, die untersuchten, ob sich die Effekte von Ang-(1-7) durch AT2R-Antagonisten aufheben lassen. Viele dieser Studien konnten in der Tat belegen, dass die AT2R-Antagonisten PD123319 oder PD123177 die Effekte von Ang-(1-7) hemmen.<sup>66-71</sup> Abbildung 2.3 zeigt eine schematische Darstellung der Beobachtungen. So untersuchten Gorelik et al. die Wirkungen von Ang-(1-7) an Koronararterien des Schweins. Hierzu wurde der Gefäßtonus der Koronararterienringe in Pufferlösung bestimmt. Nach Vorbehandlung mit Bradykinin führte Ang-(1-7) zu einer deutlichen Vasodilatation. Obwohl PD123319 keinen eigenständigen Effekt auf den Gefäßtonus hatte, konnte es die Ang-(1-7)-Wirkung signifikant hemmen.<sup>70</sup>

Wie bereits erwähnt, wurde 2003 bewiesen, dass der Rezeptor Mas die Zielstruktur für Ang-(1-7) darstellt und die Wirkungen von Ang-(1-7) über diesen Rezeptor vermittelt werden.<sup>21</sup> Zudem konnten Bindungsstudien belegen, dass Ang-(1-7) nur mit geringer Affinität an den AT2R bindet.<sup>21,72</sup> Hinsichtlich dieser Erkenntnisse bleibt ungeklärt, warum zahlreiche Studien belegen konnten, dass sich Ang-(1-7)-vermittelte Effekte durch AT2R-Antagonisten aufheben lassen.





**Abbildung 2.3:** Schematische Darstellung des „PD-Phänomens“. **Abbildung a:** Agonisten des Rezeptors Mas (z. B. Ang-(1-7)) vermitteln definierte Effekte (z. B. Vasodilatation). **Abbildung b:** Antagonisten des AT2-Rezeptors (z. B. PD123319) reduzieren die Effekte des Rezeptors Mas signifikant. Die Ursache des „PD-Phänomens“ gilt bisher als ungeklärt. Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über Studien, in welchen das „PD-Phänomen“ beschrieben wird.

Die Bedeutung dieses durch die AT2R-Antagonisten PD123319 und PD123177 ausgelösten „PD-Phänomens“ wurde durch neuere Studien bestätigt. So bewiesen auch Untersuchungen, welche nach Entdeckung des MasR durchgeführt wurden, dass AT2R-Antagonisten die Effekte von Ang-(1-7) inhibieren.<sup>73-84</sup> Überdies wurde gezeigt, dass auch die Wirkungen des synthetischen MasR-Agonisten AVE0991 durch AT2R-Antagonisten gehemmt werden.<sup>30,31</sup> Beispielsweise wurde 2004 in einer von Pinheiro und Mitarbeitern veröffentlichten Studie gezeigt, dass AVE0991 in Mäusen antidiuretisch wirkt. Durch Bindungsstudien und ergänzende Experimente in MasR-defizienten Tieren wurde belegt, dass dieser Effekt spezifisch über den Rezeptor Mas vermittelt wird. Dennoch sind die AT2R-Antagonisten PD123319 und PD123177 in der Lage die antidiuretische Wirkung zu inhibieren. Trotz der umfangreichen Diskussion möglicher Ursachen, konnten Pinheiro et al. keine konkrete Erklärung dieses Phänomens aufzeigen.<sup>31</sup>

Tabelle 2.1 gibt eine zusammenfassende Darstellung von publizierten Studien, in welchen ein „PD-Phänomen“ nachweisbar ist. Es muss jedoch auch darauf hingewiesen werden, dass Wirkungen des MasR nicht unter allen Versuchsbedingungen durch AT2R-Antagonisten inhibiert werden.<sup>85-87</sup> Beispielsweise untersuchten Freeman et al.

## 2 Einleitung

kultivierte, aortale Gefäßmuskelzellen und beobachteten, dass Ang-(1-7) die Proliferation dieser Zellen hemmt. Diese wachstumshemmende Wirkung von Ang-(1-7) wurde dabei durch die Vorinkubation mit PD123177 nicht beeinflusst.<sup>85</sup>

**Tabelle 2.1:** Übersicht über publizierte Studien mit Inhibition von MasR-vermittelten Effekten durch AT2R-Antagonisten.

<b>Erstautor</b>	<b>Publikationsjahr</b>	<b>Agonist am MasR</b>	<b>Antagonist am AT2R</b>
<b>Jaiswal</b> <sup>68</sup>	1992	Ang-(1-7)	PD123177
<b>Jaiswal</b> <sup>69</sup>	1993	Ang-(1-7)	PD123177
<b>Gironacci</b> <sup>66</sup>	1994	Ang-(1-7)	PD123319
<b>Gorelik</b> <sup>70</sup>	1998	Ang-(1-7)	PD123319
<b>Muthalif</b> <sup>67</sup>	1998	Ang-(1-7)	PD123319
<b>Heitsch</b> <sup>71</sup>	2001	Ang-(1-7)	PD123177
<b>Wiemer</b> <sup>30</sup>	2002	AVE0991	PD123177
<b>De Souza</b> <sup>73</sup>	2004	Ang-(1-7)	PD123319
<b>Pinheiro</b> <sup>31</sup>	2004	AVE0991	PD123177 / PD123319
<b>Roks</b> <sup>75</sup>	2004	Ang-(1-7)	PD123319
<b>Castro</b> <sup>76</sup>	2005	Ang-(1-7)	PD123319
<b>Walters</b> <sup>77</sup>	2005	Ang-(1-7)	PD123319
<b>Lara Lda</b> <sup>78</sup>	2006	Ang-(1-7)	PD123319
<b>Costa</b> <sup>79</sup>	2010	Ang-(1-7)	PD123319
<b>Durand</b> <sup>80</sup>	2010	Ang-(1-7)	PD123319
<b>Tesanovic</b> <sup>81</sup>	2010	Ang-(1-7)	PD123319
<b>Raffai</b> <sup>82</sup>	2011	Ang-(1-7) / AVE0991	PD123319
<b>Bosnyak</b> <sup>74</sup>	2012	Ang-(1-7)	PD123319
<b>Mordwinkin</b> <sup>83</sup>	2012	Ang-(1-7)	PD123319
<b>Jiang</b> <sup>84</sup>	2013	Ang-(1-7)	PD123319

## 2.5 Zielsetzung der Arbeit

Zahlreiche Studien konnten belegen, dass Antagonisten des Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (AT2R) die Funktionen des Rezeptors Mas (MasR) hemmen (vergleiche Tabelle 2.1). Die Ursache dieses sogenannten „PD-Phänomens“ ist bislang unklar.

Die vorliegende Arbeit soll zur Klärung dieser Beobachtungen beitragen und hierbei insbesondere der Möglichkeit einer funktionellen Interaktion zwischen den beiden Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren AT2R und MasR nachgehen. Dazu sollten ein geeignetes Untersuchungsmodell gefunden und folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Wirken die Agonisten des AT2R bzw. des MasR spezifisch an ihrem jeweiligen Rezeptor?
2. Inwieweit beeinflusst eine pharmakologische oder genetische Inhibition des AT2R die Funktionalität des Rezeptors Mas?
3. Beeinträchtigt eine pharmakologische oder genetische Inhibition des MasR die Funktionalität des AT2R?
4. Bestehen synergistische Effekte zwischen beiden Rezeptoren?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Verwendete Materialien

#### 3.1.1 Versuchstiere

Zur Herstellung der primären Astrozytenzellkulturen wurde Hirngewebe von Wildtyp-, AT2R-Knockout- und MasR-Knockout-Mäusen verwendet. Die Entnahme und Präparation des Hirngewebes erfolgte am ersten postnatalen Lebenstag. Die Züchtung und Tötung der Versuchstiere zum Zweck der Gewebeentnahme erfolgte unter Genehmigung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin (genehmigte Tötungsanzeige T0059/05). Alle Tiere besaßen denselben genetischen Hintergrund (C57BL/6J). Dabei wurden die Wildtyp-Mäuse von der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité Berlin bezogen. Die AT2R-KO Tiere stammten von Zuchtpaaren, welche von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Masatsugu Horiuchi, *Department of Molecular Cardiovascular Biology and Pharmacology, Ehime University Graduate School of Medicine*, Japan zur Verfügung gestellt wurden.<sup>88</sup> Die MasR-KO-Tiere gehen auf Zuchtpaare der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Michael Bader des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin Berlin zurück.<sup>89</sup> Die Tierhaltung erfolgte im Tierstall des *Centers of Cardiovascular Research* der Charité Berlin entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen des Landes Berlin. Zum Erreichen genetischer Homogenität wurden die Tiere verpaart, rückgekreuzt und in regelmäßigen Abständen durch Genotypisierungen mittels PCR aus genomischer DNA (gDNA) von Schwanzspitzenproben überprüft.

#### 3.1.2 Chemikalien, Antikörper und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
A-779	Bachem, Torrance, USA
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Amphotericin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Angiotensin-(1-7)	Bachem, Torrance, USA
Anti-GLAST-Antikörper	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Anti-GFAP-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa

### 3 Material und Methoden

---

Anti- <i>Rabbit</i> -Sekundärantikörper	Cruz, USA
<i>Compound 21</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Vicore Pharma, Göteborg, Schweden
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Promega, Madison, USA
DNase Puffer RQ1	Promega, Madison, USA
<i>DNase Stop Solution RQ1</i>	Promega, Madison, USA
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Eisessig	Merck KG, Darmstadt
Ethanol 100 %	Herbeta Arzneimittel, Berlin
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure- dinatrium-Dihydrat (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>GeneRuler Low Range DNA Ladder</i>	Fermentas, GmbH, St. Leon-Rot
Gentamycin	Biochrom AG, Berlin
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Orange G	Merck KGaA, Darmstadt
PD123319	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Power Sybr Green PCR Master Mix</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Random Primers</i> (500 µg/ml)	Promega, Madison, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin / EDTA (0,05 % / 0,02 %)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Wasser, ultrarein	Biochrom AG, Berlin

### 3.1.3 Enzyme

DNase RQ1	Promega, Madison, USA
rDNase	Macherey-Nagel, Düren

### 3.1.4 Kits

Nucleospin RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
SuperScript II Reverse Transkriptase Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

96 Well Multiply PCR Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen 1ml, 26 G x 1/2"	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
PCR Klebefolien, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

### 3.1.6 Geräte

<i>Cryo 1 °C Freezing Container</i>	Nalgene Thermo Fischer Scientific, Penfield, New York, USA
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Geldokumentationsgerät	Syngene, Cambridge, UK
Gelelektrophoresekammer 250 EX	Armin Baack, Schwerin
Gelelektrophoresesystem Midi/Maxi	Harnischmacher, Kassel
Horizontalschüttler KS 260	IKA-Werke, Staufen
Inkubator HERAcell 150	Kendro, Langenselbold
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg

### 3 Material und Methoden

---

Lichtmikroskop Leica DM IL	Leica, Wetzlar
Mikrowelle	Micromat 21, AEG, Nürnberg
<i>real-time</i> PCR-System Mx3000P	Stratagene, La Jolla, USA
Sicherheitswerkbank Lamin Air Safe 2010	Heto-Holten, Allerød, Dänemark
Spannungsquelle für Elektrophorese Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Spektrometer NanoDrop ND-1000	Peqlab, Wilmington, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Neolab, Heidelberg
Vakuumsaugpumpe	KNF Neuberger, Freiburg
Wasserbad WB14	Memmert, Schwabach
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

#### 3.1.7 Zellkulturmedien

Einfriermedium	90 % FKS
	10 % DMSO
Hungermedium	<i>DMEM</i>
	0,5 % FKS
	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
Kulturmedium	<i>DMEM</i>
	10 % FKS
	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin

### 3.1.8 Software

EndNote X.0.2	Thomson, Carlsbad, USA, 1988-2006
GraphPad Prism Version 5.01	GraphPad Software. Inc., San Diego, USA, 1992-2007
GraphPad Quick Calcs	GraphPad Software. Inc., San Diego, USA, 2002-2005
Mx 3000P Version 4.10	Stratagene, La Jolla, USA, 2007
Nanodrop 1000 Spectrophotometer Software Version 3.7	Peqlab, Wilmington, USA
Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA, 2007
Primer-Blast	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA, 1996-2007

## 3.2 Zellbiologische Methoden

Die Experimente dieser Arbeit wurden, sofern nicht anders angegeben, in Astrozyten-Primärzellkulturen durchgeführt. Alle Arbeiten mit Primärzellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an Präparations- und Sterilbänken durchgeführt. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Inkubationsschritte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt.

### 3.2.1 Anlegen einer primären Astrozytenzellkultur

Zur Isolierung der Astrozyten wurden jeweils 15 Mäuse des Stamms C57BL/6J am ersten postnatalen Lebenstag mit 70 % Ethanol desinfiziert und durch Dekapitation getötet. Nach Eröffnung der Schädeldecke wurde das Hirn freipräpariert und entnommen. Unter dem Mikroskop wurden alle am Hirn befindlichen Gefäße und Meningen sowie das Kleinhirn entfernt. Nachfolgend wurden die Gehirne mehrfach in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Jeweils drei Gehirne wurden in ein 50 ml Röhrchen mit 10 ml Kulturmedium überführt. Mehrfaches Pipettieren mit einer Pasteurpipette führte zur gewünschten Homogenisierung des Gewebes sowie zu einer Vereinzelung der Zellen. Anschließend wurde das homogenisierte Hirngewebe durch Zentrifugation (2000 UpM,



1 min), Verwerfen des Überstandes und Resuspension in neuem Kulturmedium gereinigt.

Die Suspension wurde auf 30ml mit Kulturmedium aufgefüllt und in Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) zur Inkubation überführt. Nachfolgend wurde das Kulturmedium zunächst 48 Stunden nach Isolierung, später alle 2-3 Tage gewechselt.

### **3.2.2 Übergang in eine Astrozytenmonokultur**

Das ursprünglich gewonnene Hirngewebe bestand aus Neuronen und Gliazellen, d.h. Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia, wobei Astrozyten bereits zu Beginn der zahlenmäßig weitaus häufigste Zelltyp waren. Da die Hirne von Mäusen des ersten postnatalen Tages stammten, waren die Neurone nicht mehr teilungsfähig und dadurch nach wenigen Tagen nicht mehr in den Kulturen nachweisbar. Um eine möglichst reine Astrozytenzellkultur zu erhalten, wurden bei jedem Mediumwechsel Oligodendrozyten und Mikroglia für 30 Minuten mit dem Horizontalschüttler abgelöst und mit PBS weggespült. Zudem führte die, verglichen mit Astrozyten, wesentlich geringere Teilungsrate von Oligodendrozyten und Mikroglia zur baldigen Ausbildung einer Astrozytenmonokultur. Die Kultivierung wurde auf diese Weise bis zum Erreichen vollständiger Konfluenz fortgesetzt. Danach konnten die Zellen subkultiviert und in neue Zellkulturgefäße umgesetzt werden.

Zur Evaluation der Reinheit der Astrozyten wurden regelmäßig immunzytochemische Untersuchungen mit den beiden Astrozytenmarkern saures Gliafaserprotein (GFAP) und Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST) durchgeführt.

### **3.2.3 Subkultivierung der Astrozyten**

Hatten die Zellen in den Kulturflaschen die gewünschte Konfluenz von 100 % erreicht, konnten sie subkultiviert werden. Dabei wurden die Zellen zunächst zweimalig mit 37 °C warmem PBS gewaschen um möglichst alle proteinhaltigen Rückstände des Mediums sowie Kalzium- und Magnesiumionen zu entfernen. Die adhärenen Zellen wur-

den durch Benetzung mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation bei 37 °C vom Flaschenboden gelöst. Die so gewonnene Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 1500 UpM zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet konnte anschließend in Kulturmedium resuspendiert und auf zwei neue mit 37 °C warmem Kulturmedium gefüllte Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) verteilt werden.

### **3.2.4 Kryokonservierung und Rekultivierung der Astrozyten**

Nach Isolierung und Kultivierung konnten die reinen Astrozyten bis zum Beginn der Experimente in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Zum Einfrieren wurden die Astrozyten, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, trypsinisiert und sedimentiert. Das Zellpellet wurde in dimethylsulfoxidhaltigem Medium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Zur gleichmäßigen Abkühlung um 1 °C pro Minute wurden die Kryoröhrchen in *Cryo 1 °C Freezing Containern* platziert und bei -80 °C eingefroren. Nach zwei Tagen wurden die Kryoröhrchen zur dauerhaften Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Rekultivieren wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Kryoröhrchen zügig im 37 °C-Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die in den Kryoröhrchen enthaltene Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen überführt, welches mit 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium gefüllt war. Die Zellsuspension und das Kulturmedium wurden durchmischt und bei 1500 UpM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet resuspendiert und in die Kulturflaschen zur weiteren Kultivierung überführt.

### **3.2.5 Vorbereitung der Zellen für Stimulationsexperimente**

Zur Durchführung der Stimulationsexperimente war es notwendig, die Astrozyten in kleinere Experimentierflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> zu überführen. Das Umsetzen erfolgte, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, jedoch wurden die Zellen nicht weiter verdünnt, sodass jeweils aus einer Kulturflasche mit 175 cm<sup>2</sup> konfluentem Astrozytenzellrasen sieben Experimentierflaschen mit 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche befüllt wurden.

Um eine maximale Vergleichbarkeit der Astrozyten in den einzelnen Experimentierflaschen zu gewährleisten, wurden bei diesem Schritt alle Astrozyten gepoolt. Für das Poolen wurden alle aus Kulturflaschen gewonnenen Zellpellets gemeinsam in eine einzige Zellsuspension gebracht. Diese Zellsuspension wurde zu gleichen Teilen auf die Experimentierflaschen aufgeteilt. Nach 48 Stunden Inkubationszeit waren die Astrozyten in den Experimentierflaschen angewachsen, konfluent und experimentierbereit.

Da die Experimente nicht während der Wachstumsphase der Astrozyten erfolgen sollten, wurde zum Erzielen eines Proliferationsstillstandes der Zellen und um möglichen Interferenzen zwischen den im FKS enthaltenen Substanzen vorzubeugen, der FKS-Gehalt in den Experimentierflaschen auf 0,5 % verringert. Hierfür wurde das Medium aus den Flaschen entfernt, der Zellrasen zweimalig mit PBS gespült und anschließend mit Hungermedium beschichtet. Nach 24-stündiger Inkubation in Hungermedium erfolgten die Stimulationsexperimente.

#### 3.2.6 Durchführung der Stimulationsexperimente

Die Astrozyten wurden durch Zugabe verschiedener Substanzen zum Medium stimuliert. So erfolgten Stimulationen mit:

- **Ang-(1-7)** (Mas-Rezeptor-Agonist) in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$
- **C21** (AT2-Rezeptor-Agonist) in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$
- **A-779** (Mas-Rezeptor-Antagonist) in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$
- **PD123319** (AT2-Rezeptor-Antagonist) in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$
  
- **Kombinationen der genannten Substanzen**
  
- TNF $\alpha$  als **Positivkontrolle** in einer Konzentration von 10 ng/ $\mu\text{l}$
- hochreinem Wasser als **Negativkontrolle**

Ang-(1-7) und C21 werden im Folgenden als Agonisten bezeichnet, PD123319 und A-779 als Antagonisten.

### **3.2.6.1 Herstellung der Wirkstofflösungen**

Die Agonisten bzw. Antagonisten, welche in Pulverform vorlagen, wurden mit der Feinwaage abgewogen und entsprechend den Herstellerempfehlungen mit einer Zielkonzentration von 1 mM in hochreinem Wasser gelöst. Als Positivkontrolle wurde TNF $\alpha$  in einer Konzentration von 10 ng/ $\mu$ l verwendet. Als Negativkontrolllösung diente hochreines Wasser ohne Agonist oder Antagonist.

### **3.2.6.2 Stimulationsexperimente**

Bei alleiniger Stimulation ohne Rezeptorantagonisten wurde die Wirkstofflösung von Ang-(1-7) oder C21 im Verhältnis 1:1000 in das Hungermedium der Experimentierflaschen gegeben. Hieraus ergibt sich eine Endkonzentration der Stimulationssubstanz im Medium von 1  $\mu$ M. Die Zellen wurden anschließend 6 Stunden inkubiert.

Bei Stimulation mit vorheriger Rezeptorantagonisierung wurde zunächst die Wirkstofflösung von PD123319 oder A-779 im Verhältnis 1:100 in das Hungermedium der Experimentierflaschen gegeben. Hieraus ergibt sich eine Endkonzentration der Antagonisten im Medium von 10  $\mu$ M. Die Zellen wurden 60 Minuten zur Rezeptorantagonisierung vorinkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit dem Agonisten, wie oben beschrieben, zugegeben. Die Experimentierflaschen wurden weitere 6 Stunden inkubiert.

### **3.2.6.3 Zellernte**

Nach Abschluss der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, gelöst, in Kulturmedium resuspendiert und zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimalig mit PBS gewaschen und schließlich als Zellpellet bei -80 °C eingefroren.

### 3.3 RNA-Isolierung

#### 3.3.1 RNA-Isolierung aus Zellpellets

Die Isolierung der RNA aus den gefrorenen Astrozytenpellets erfolgte mit Hilfe des Nucleospin RNA II - Kits von Macherey-Nagel gemäß den Herstellerempfehlungen. Dazu wurden die gefrorenen Astrozyten-Zellpellets aufgeschossen, indem sie zunächst mit einem milden Detergenz und  $\beta$ -Mercaptoethanol gelöst wurden. Eine weitere mechanische Zellyse erfolgte durch das mehrfache Passieren der Lösung durch die dünne Kanüle einer Einmalspritze. Anschließend wurden die Nukleinsäuren an eine Siliziumdioxidmatrix gebunden. Die an die Matrix gebundene DNA wurde mittels DNase zerstört und durch mehrere Waschschrirte entfernt. Anschließend wurde die RNA mithilfe von RNase freiem Wasser eluiert.

#### 3.3.2 Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA

Die Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA wurde mittels Spektralphotometrie bestimmt. Dabei wurde die Absorption bei  $\lambda=260$  nm ( $A_{260}$ ), dem Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren, sowie bei  $\lambda=280$  nm ( $A_{280}$ ), dem Absorptionsmaximum für Proteine, gemessen. Die RNA-Konzentration konnte nachfolgend mittels Formel (1) direkt aus dem  $A_{260}$ -Wert errechnet werden.

$$\text{Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40 \quad (1)$$

Durch Bestimmung des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  ist es möglich, Rückschlüsse auf Verunreinigungen mit Proteinen zu ziehen. Um diese Verunreinigungen auszuschließen, sollte der Quotient stets zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

### 3.4 cDNA-Synthese

Um die gewonnene RNA mittels *real-time* PCR quantifizieren zu können, war es erforderlich, die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Hierfür wurden

1000 ng der isolierten RNA in Eppendorfgefäße gegeben und mit ultrareinem Wasser auf 7 µl aufgefüllt.

Um DNA-Verunreinigungen in den RNA-Lösungen sicher ausschließen zu können, wurde an dieser Stelle eine zweite Behandlung mit DNase eingefügt. Hierzu wurden die Proben für 30 Minuten mit 1 µl DNase und 1 µl DNase Puffer bei 37 °C inkubiert. Durch anschließende 10-minütige Inkubation mit 1 µl *Stop Solution* bei 65 °C wurde die DNase inaktiviert. Um mögliche Verunreinigungen der Proben oder der verwendeten Reagenzien mit DNA anzuzeigen, wurden Negativkontrollen mitgeführt. Dazu wurde die RNA in einem parallelen Ansatz in gleicher Weise behandelt, jedoch wurde im finalen Schritt die reverse Transkriptase durch *First Strand Buffer* ersetzt. Die Negativproben wurden anschließend ebenfalls mittels *real-time* PCR gemessen, wobei Verunreinigungen mit DNA offenbar geworden wären.

Die anschließende cDNA-Synthese erfolgte mittels SuperScript II Reverse Transkriptase Kit entsprechend den Herstellerempfehlungen von Invitrogen. Um Schwankungen durch kleine Pipettierolumina zu vermeiden, wurden alle Zusätze als Mix zu den Proben gegeben. Dazu wurden zunächst jeder Probe 0,5 µl unverdünnte *Random Primer* sowie 0,5 µl ultrareines Wasser und 1 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) zugesetzt. Diese wurden zum Anlagern der *Random Primer* für 5 Minuten bei 65 °C erwärmt.

Jedem Reaktionsansatz wurden

- 4 µl *First Strand Buffer*
- 2 µl DTT
- 1 µl *RNase Out*
- 1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase

hinzugefügt. Alles wurde durchmischt und anzentrifugiert. Der Ansatz wurde zunächst für 10 Minuten bei 25 °C und anschließend für 50 Minuten bei 42 °C im Thermomixer

inkubiert. Im Anschluss wurde die Reverse Transkriptase für 15 Minuten bei 70 °C inaktiviert. Das Reaktionsgemisch wurde mit hochreinem Wasser auf 250 µl aufgefüllt.

### 3.5 Quantitative *real-time* PCR

#### 3.5.1 Theorie der *real-time* PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (englisch: *real-time* PCR) ist, genau wie die herkömmliche PCR, ein Prozess zur *in vitro* Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte. Die *real-time* PCR unterscheidet sich von der konventionellen PCR insbesondere durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen. Diese Farbstoffe fluoreszieren, sobald sie mit doppelsträngiger DNA interkalieren. Somit steigt mit jedem Amplifikationszyklus nicht nur die Menge an doppelsträngiger DNA, sondern auch das von den Farbstoffen ausgehende Fluoreszenzsignal. Die Messung des Fluoreszenzsignals erlaubt somit ein Verfolgen der DNA-Vervielfältigung in Echtzeit. Um die Menge der in den Proben enthaltenen DNA für ein bestimmtes Gen zu ermitteln, wird ein Fluoreszenzschwellenwert festgelegt, d.h. ein bestimmter Wert für die Stärke des Fluoreszenzsignals, der im Laufe der PCR überschritten wird. Je mehr cDNA des gesuchten Gens in der Probe vorhanden ist, desto früher wird der Fluoreszenzschwellenwert überschritten. Die Menge der für das Zielgen kodierenden DNA wird angegeben als Schwellenwertzyklus (englisch *threshold cycle*, kurz CT), d.h. es wird der Amplifikationszyklus der PCR angegeben, bei dem das Fluoreszenzsignal den Fluoreszenzschwellenwert überschreitet, dabei steht ein kleiner Schwellenwertzyklus für eine große Menge DNA.

#### 3.5.2 Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen

Zur Durchführung der *real-time* PCR wurde *Power Sybr Green PCR Master Mix* verwendet, der alle für die *real-time* PCR erforderlichen Komponenten bis auf die cDNA der Proben, Wasser und die Primer für das zu messende Gen enthält. Zum Messen der relativen Genexpression mit quantitativer *real-time* PCR wurden jeweils

10,0 µl	cDNA der Proben
0,6 µl	<i>sense</i> Primer

0,6 µl	<i>antisense</i> Primer
1,3 µl	hochreines Wasser
12,5 µl	<i>Power Sybr Green PCR Master Mix</i>

in ein Well einer 96 Well-Platte gegeben. Die Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und bei 4000 UpM für 60 Sekunden zentrifugiert. Die *real-time* PCR wurde entsprechend den Empfehlungen von Applied Biosystems zur Verwendung des *Power SYBR Green PCR Master Mix* unter folgendem Temperatur-Zeit-Profil durchgeführt:

**Tabelle 3.1:** Temperatur-Zeit-Profil der *real-time* PCR.

Temperatur	Zeit	Phase	
10 min	95 °C	Initiale Denaturierung und Aktivierung der DNA Polymerase	
15 s	95 °C	Denaturierung	} 40 x
60 s	60 °C	Primeranlagerung	
30 s	72 °C	Elongation	
30 s	55 °C	Schmelzkurvenanalyse	
30 s	95 °C	Schmelzkurvenanalyse	

Um Schwankungen der einzelnen Reaktionsansätze minimal zu halten, wurden alle Reagenzien als Mix zur cDNA zugefügt. Zudem wurde jede Probe dreifach gemessen und ein Mittelwert gebildet. Für Negativkontrollen wurden Zweifachmessungen angefertigt. Die Expression des Zielgens wurde auf die Expression des stabil exprimierten *Housekeeping*-Gens Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) normalisiert.

### 3.5.3 Design und Auswahl geeigneter Primer

#### 3.5.3.1 Design geeigneter Primer

Die Primer für die quantitative *real-time* PCR wurden mithilfe der Software Primer-Blast entworfen, wobei auf folgende Bedingungen geachtet wurde: Die Länge des amplifi-



zierten PCR-Produktes sollte zwischen 70 und 250 Basenpaaren sein. Die Schmelzpunkte sollten zwischen 58 °C und 60 °C liegen und die Differenz der Schmelzpunkte zwischen beiden Primern sollte maximal 1 °C betragen. Falls möglich, sollten die Primer eine Exon-Exon-Grenze überspannen. Der Guanin-Cytosin-Gehalt sollte zwischen 30 % und 80 % liegen. Es wurde darauf geachtet, dass die Primerpaare spezifisch für die DNA von Mäusen waren, so dass mögliche kleinste Verunreinigungen etwa mit humaner oder Ratten-DNA, nicht in der PCR amplifiziert wurden. Für jedes zu untersuchende Gen wurden mehrere Primerpaare bezogen. Mittels *real-time* PCR wurden die Primer hinsichtlich ihrer Schmelzkurven und Primereffizienz untersucht bis ein Primerpaar mit optimalen Bedingungen gefunden wurde. Anschließend wurde das entstandene PCR-Produkt durch Agarose-Gelelektrophorese auf Reinheit und Richtigkeit untersucht.

### **3.5.3.2 Schmelzkurvenanalyse**

Die Schmelzkurvenanalyse wurde durchgeführt um unspezifische Primerdimerbildungen auszuschließen. Hierzu wurde die Temperatur kontinuierlich von 55 °C auf 95 °C erhöht. Bei einer für das amplifizierte PCR-Produkt spezifischen Temperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei Einzelsträngen. Da das verwendete *SYBR Green* als interkalierender Farbstoff lediglich an doppelsträngige DNA bindet, registriert der PCR Cycler bei der spezifischen Schmelztemperatur einen Abfall des Fluoreszenzsignals. Bei Bildung von unspezifischen Primerdimeren kommt es zur Aufzeichnung mehrerer Schmelzpunkte. Primerpaare, bei welchen mehrere Schmelzpunkte festgestellt wurden, konnten so ausgeschlossen werden.

### **3.5.3.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren, bei welchem mithilfe eines elektrischen Gleichspannungsfeldes negativ geladene DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Je weniger Basen das entstandene PCR-Produkt umfasst, desto kleiner und leichter ist es und desto weiter läuft es in einer vorgegebenen Zeit in Richtung Anode. Eine zusätzlich zu den Proben mitgeführte DNA-Leiter enthält DNA-Fragmente definierter Größen und dient als Eichstandard. Der Vergleich des entstan-

denen PCR-Produktes mit der DNA-Leiter ermöglicht so die ungefähre Bestimmung der Produktlänge. Auf diese Weise wurde die Länge des entstandenen PCR-Produktes in der Gelelektrophorese bestimmt und mit der theoretisch errechneten PCR-Produktlänge verglichen. Nur Primerpaare, die zu einem distinkten Amplifikationsprodukt mit korrekter Sequenzgröße führten, wurden verwendet.

Zur Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese wurde 2 %-iges Agarosegel aufgekocht. Nach ca. zehnminütiger Abkühlung wurde das flüssige Gel mit Ethidiumbromid versetzt, wobei je 5 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Gel zugegeben wurden. Das flüssige Gel wurde auf den Gelträger gegossen. Nach Abkühlung und Auspolymerisierung wurde das Gel in eine Gelelektrophoresekammer gegeben und mit TAE-Puffer beschichtet. Die Proben mit den PCR-Produkten wurden im Verhältnis 1:10 mit Orange G versetzt und in die Geltaschen gegeben. Es wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Nach ca. 35 Minuten waren die DNA-Fragmente deutlich aufgetrennt. Das Ergebnis wurde unter UV-Licht betrachtet und photographisch dokumentiert.

#### **3.5.3.4 Bestimmung der Primereffizienz**

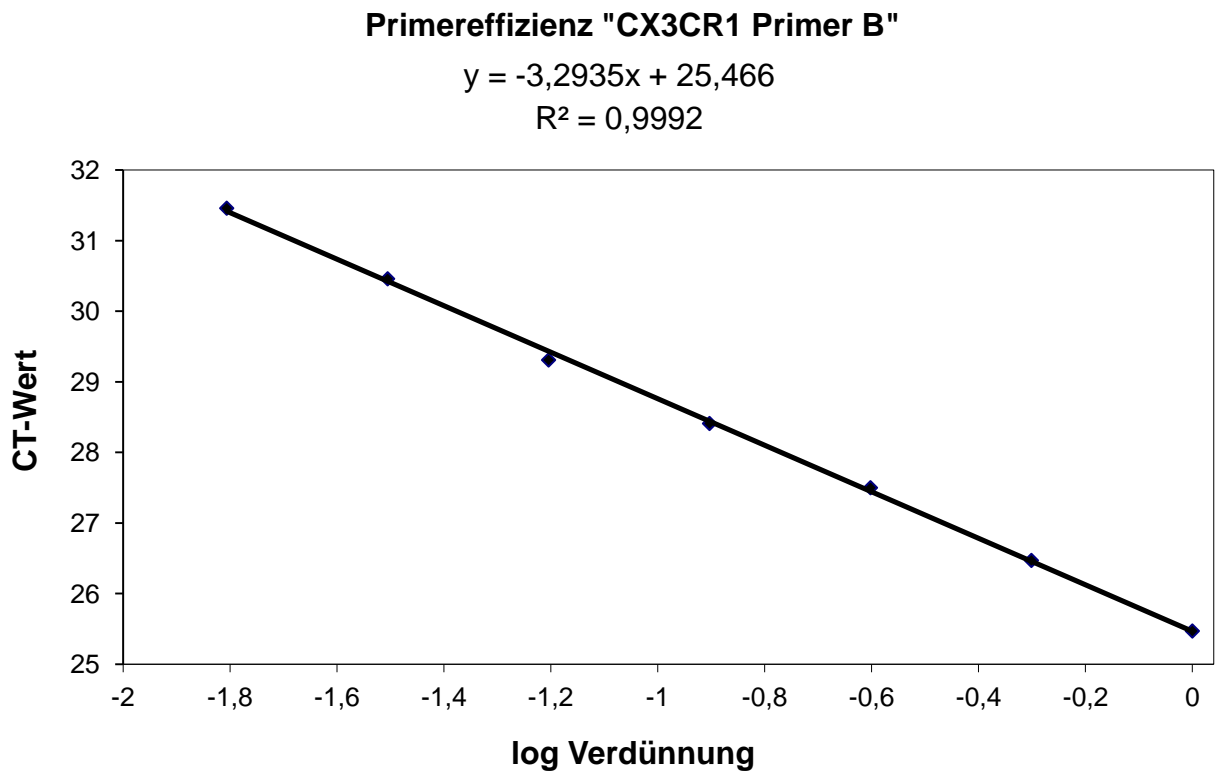
Grundlage für eine Bestimmung der Primereffizienz ist die Annahme, dass sich bei einer PCR der DNA-Gehalt mit jedem Amplifikationsschritt verdoppelt. Die Primereffizienz entspricht in diesem Fall 2,0. In der Realität ist dies selten gegeben, da Primer suboptimal binden oder PCR-Temperaturen nicht ideal eingestellt sind. Mithilfe einer Verdünnungsreihe kann dies überprüft werden. Dazu wurde eine Probe wiederholt 1:2 verdünnt, bis eine Verdünnungsreihe mit mindestens sieben Messpunkten entstanden war (siehe Tabelle 3.2). Bei optimalen Bedingungen steigt der CT-Wert mit jeder Verdünnung um +1. Der CT-Wert der Verdünnungsreihe wurde mittels *real-time* PCR bestimmt und in Microsoft Office Excel gegen den dekadischen Logarithmus der Verdünnung aufgetragen. Der Anstieg  $m$  der so erhaltenen Gerade wurde mittels linearer Regression berechnet (vergleiche Diagramm 3.1).

### 3 Material und Methoden

**Tabelle 3.2:** Berechnung der Primereffizienz am Beispiel von CX3CR1, hier für das zweite bestellte Primerpaar „CX3CR1 Primer B“.

Verdünnung	Verdünnung (dezimal)	Log der Verdünnung	CT-Wert
unverdünnte Probe	1	0	<b>25,47</b>
1:2	0,5	-0,30103	<b>26,47</b>
1:4	0,25	-0,60206	<b>27,5</b>
1:8	0,125	-0,90309	<b>28,41</b>
1:16	0,0625	-1,20412	<b>29,31</b>
1:32	0,03125	-1,50515	<b>30,46</b>
1:64	0,015625	-1,80618	<b>31,46</b>

**Diagramm 3.1:** Berechnung der Primereffizienz am Beispiel von CX3CR1, hier für das Primerpaar „CX3CR1 Primer B“.



Die Primereffizienz E konnte nun entsprechend Formel (2) berechnet werden.

$$E = 10^{-1/m} \quad (2)$$

Division durch 2,0 erlaubt eine Angabe der Primereffizienz in Prozent. Im Fall von CX3CR1 Primervariante B ergab sich somit eine Effizienz von 2,00 bzw. 100 %.

#### 3.5.4 Quantitative Auswertung der *real-time* PCR

Die quantitative Auswertung erfolgte mittels  $\Delta\Delta$ CT-Methode. Diese Rechenmethode erlaubt die Bestimmung der relativen Genexpression ohne die exakte Anzahl an Genkopien in der cDNA-Menge zu kennen. Grundlage der Berechnung sind die in der *real-time* PCR ermittelten CT-Werte. Hierbei müssen für jede Genexpression vier CT-Werte gemessen werden:

- der CT-Wert des *Housekeeping*-Gens der Probe,  $CT_{\text{HKG Probe}}$
- der CT-Wert des Zielgens der Probe,  $CT_{\text{ZG Probe}}$
- der CT-Wert des *Housekeeping*-Gens der Kontrollgruppe,  $CT_{\text{HKG Kontrolle}}$
- der CT-Wert des Zielgens der Kontrollgruppe,  $CT_{\text{ZG Kontrolle}}$

In drei Rechenschritten wird R, die relative Genexpression des Zielgens der Probe, ermittelt (vergleiche Formel (3) bis (6)).

$$\Delta CT_{\text{Probe}} = CT_{\text{ZG Probe}} - CT_{\text{HKG Probe}} \quad (3)$$

$$\Delta CT_{\text{Kontrolle}} = CT_{\text{ZG Kontrolle}} - CT_{\text{HKG Kontrolle}} \quad (4)$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Probe}} - \Delta CT_{\text{Kontrolle}} \quad (5)$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta CT} \quad (6)$$

### 3.6 Graphische Darstellungen

Zur Veranschaulichung molekularer Prozesse wurden für diese Arbeit Darstellungen mittels Microsoft Office PowerPoint 2007 erstellt. Dabei wurden zum Teil auch Abbildungen der PowerPoint-Datei „*Receptors and Channels*“ des Anbieters Servier Medical Art verwendet.<sup>88</sup>

### 3.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung wurde das Programm GraphPad Prism verwendet. Mehrere unabhängige, gleichartige Experimente wurden zusammengefasst und es wurde der Mittelwert gebildet. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM; *standard error of the mean*). Bei der statistischen Auswertung mehrerer Gruppen wurden die Ergebnisse unter Annahme einer Normalverteilung der Mittelwerte zunächst einer zweiseitigen Varianzanalyse unterzogen, anschließend wurde eine bestehende Signifikanz durch die Bonferroni-Methode geprüft. Als statistisch signifikant wurden Tests mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  bezeichnet. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz beim Vergleich zweier Gruppen wurde ein T-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Wiederum galten Tests mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  als statistisch signifikant.

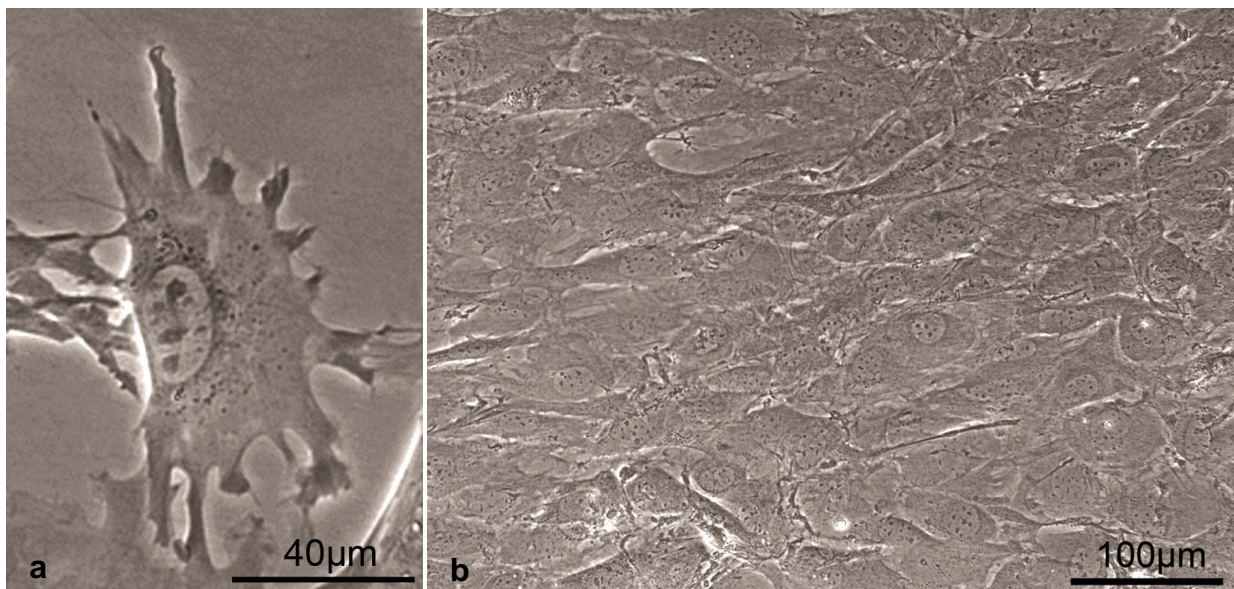
## 4 Ergebnisse

### 4.1 CX3CR1-mRNA-Expression nach Rezeptorstimulation in Astrozyten

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung möglicher Interaktionen zwischen dem Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (AT2-Rezeptor, AT2R) und dem Rezeptor Mas (MasR). Als Untersuchungsmodell wurden murine Astrozyten gewählt, welche, wie bereits durch Fogarty et al. nahe gelegt, sowohl den MasR als auch den AT2R exprimieren.<sup>90,91</sup> Die Einzelstimulation der Rezeptoren führte zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression des Chemokinrezeptors *CX3C receptor 1* (CX3CR1), welche mittels *real-time* PCR gemessen wurde.

#### 4.1.1 Primärzellkulturen von Astrozyten der Maus

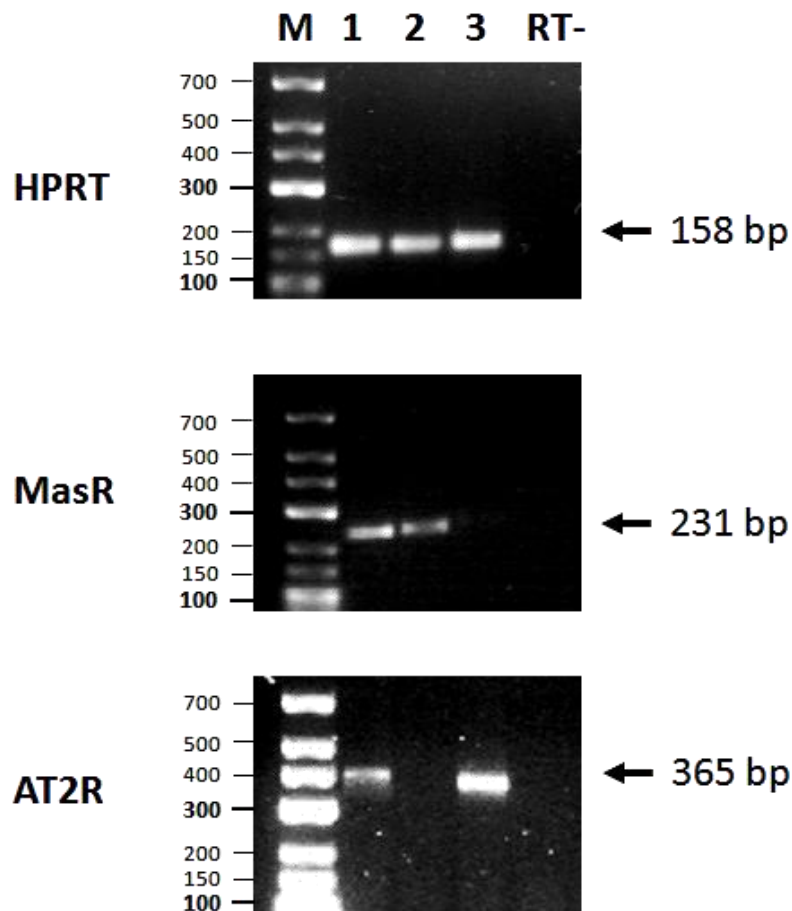
Astrozyten wurden durch Präparation von Hirnen neonataler Wildtyp-, AT2R-KO und MasR-KO Mäuse isoliert und kultiviert. Abbildung 4.1 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen dieser Astrozyten – als einzelne Zelle sowie im dichten Zellverband.



**Abbildung 4.1:** Lichtmikroskopische Aufnahme von kultivierten Astrozyten einer Wildtyp-Maus. **Abbildung a** zeigt eine einzelne Zelle, welche die für Astrozyten typische Morphologie mit zahlreichen Zellfortsätzen aufweist. In **Abbildung b** sind Astrozyten von Wildtyp-Mäusen im Zellverband nach Erreichen der Konfluenz zu sehen. Die Zellen liegen in engem Kontakt zueinander und es ist keine freie Oberfläche mehr erkennbar.

## 4 Ergebnisse

Die Kulturen zeigten sowohl in der Weißlichtmikroskopie als auch in immunzytochemischen Untersuchungen auf GLAST und GFAP stets einen Astrozytenzellanteil von  $\geq 98\%$ . Die AT2R- und MasR-Expression der verwendeten murinen Astrozytenkulturen wurde, wie Abbildung 4.2 dargestellt, durch PCR mit anschließender Gelelektrophorese verifiziert.



**Abbildung 4.2:** Gelelektrophorese zur Analyse der Expression des AT2-Rezeptors sowie des Rezeptors Mas in murinen Astrozyten. RNA wurde aus primären Astrozyten von Wildtyp, AT2R-KO und MasR-KO Mäusen extrahiert und in reverse cDNA transkribiert. Anschließend erfolgte eine PCR mit spezifischen Primern für den AT2-Rezeptor und den Rezeptor Mas. Die PCR-Produkte wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und in einem 2%-igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht. Alle Proben zeigten vergleichbare Expressionen des *Housekeeping*-Gens HPRT. **M:** DNA Marker (GeneRuler Low Range Marker) **1:** Astrozyten aus Wildtyp-Mäusen. **2:** Astrozyten aus AT2R-KO-Mäusen. **3:** Astrozyten aus MasR-KO-Mäusen. **RT-:** Negativkontrolle. Als Negativkontrolle wurde RNA aus Wildtyp-Mäusen analog zu den Proben 1-3 behandelt, jedoch wurde dem Reaktionsansatz keine reverse Transkriptase zugesetzt.

Die Primersequenzen für die PCR zum Rezeptornachweis wurden so generiert, dass sie sich exakt in dem Bereich der mRNA des Rezeptorgens anlagerten, welcher in den Zellen mit funktionellem Rezeptor-Knockout deletiert war. Somit wurde in Proben aus Knockout-Mäusen keine cDNA amplifiziert und dadurch die Rezeptordefizienz in Proben aus Knockout-Mäusen bestätigt.

#### 4.1.2 CX3CR1-mRNA-Expression nach Rezeptorstimulation

##### 4.1.2.1 Vorauswahl der zu untersuchenden Gene

Zur Untersuchung möglicher Rezeptorinteraktionen war es erforderlich, in einer experimentellen Vorphase Gene zu identifizieren, deren Expression sowohl durch die Stimulation des AT2R als auch des MasR reguliert wird. Grundlage für die Suche nach einem solchen Gen bildeten eine systematische Recherche und Analyse der bereits publizierten Literatur sowie eine Genexpressionsanalyse, welche für unsere Arbeitsgruppe angefertigt worden war. In dieser noch unpublizierten Analyse waren aus einer Gesamtzahl von 84 Genen mehrere Botenstoffe und Rezeptoren identifiziert worden, die in primären Neuronen *in vitro* durch AT2-Rezeptor-Stimulation vermehrt exprimiert wurden. Aufbauend darauf wurde die Expression der in Tabelle 4.1 aufgeführten Gene nach Stimulation des AT2R und MasR getestet.

**Tabelle 4.1:** Gene, deren Expression nach Stimulation des AT2R und MasR untersucht wurde.

Gensymbol	Gen-ID	Gename	Funktion
Bcl-2	12043	<i>B-cell lymphoma 2- protein</i>	Apoptoseregulationsprotein
BDNF	12064	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>	Neurotrophin
CX3CR1	13051	<i>CX3C receptor 1</i>	Chemokinrezeptor
NTRK2	18212	<i>Neurotrophic tyrosine kinase receptor, type 2</i>	Neurotrophinrezeptor

Diese Gene sollten auf ein möglichst stabiles *Housekeeping*-Gen normalisiert werden. Hierzu wurden die in Tabelle 4.2 zusammengefassten *Housekeeping*-Gene getestet.



**Tabelle 4.2:** *Housekeeping*-Gene, deren Regulation nach Stimulation des AT2R und MasR untersucht wurden.

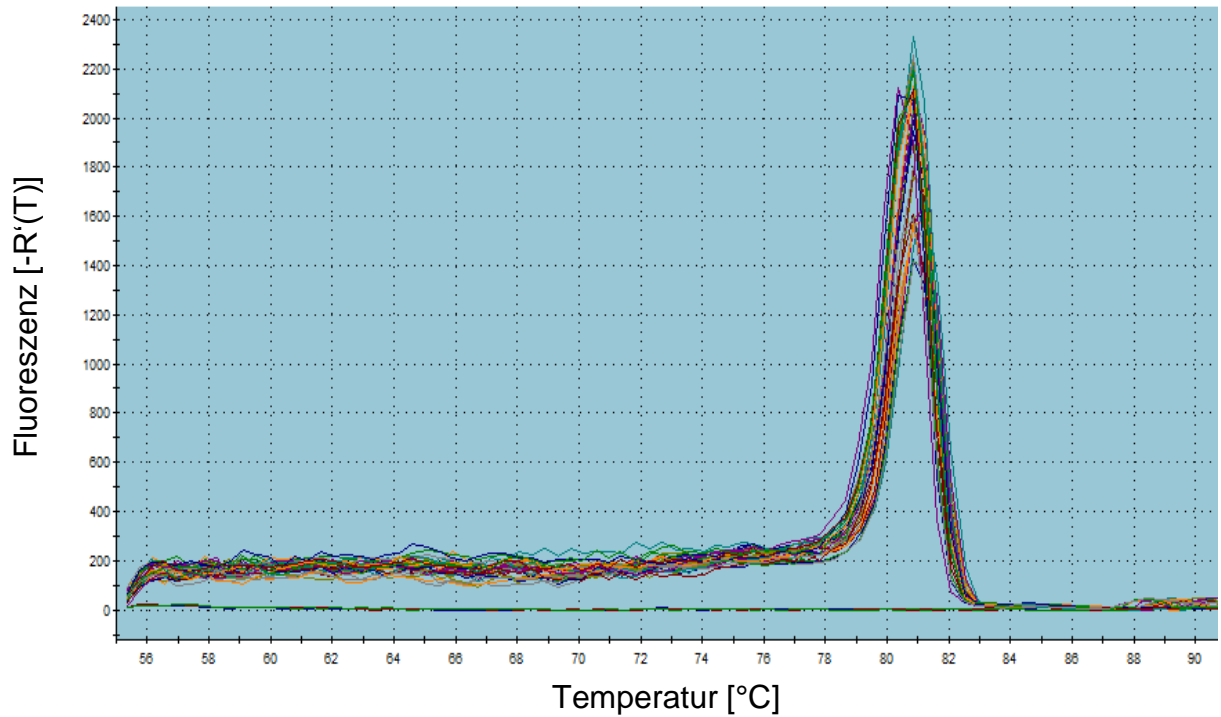
<b>Gensymbol</b>	<b>Gen-ID</b>	<b>Genname</b>	<b>Funktion</b>
18S	19791	die ribosomale Ribonukleinsäure 18S	ribosomale Ribonukleinsäure
GAPDH	14433	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Glykolyseenzym
HPRT	15452	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase	Purinstoffwechsellenzym

#### 4.1.2.2 Schmelzkurvenanalyse, Agarose-Gelelektrophorese und Primereffizienz

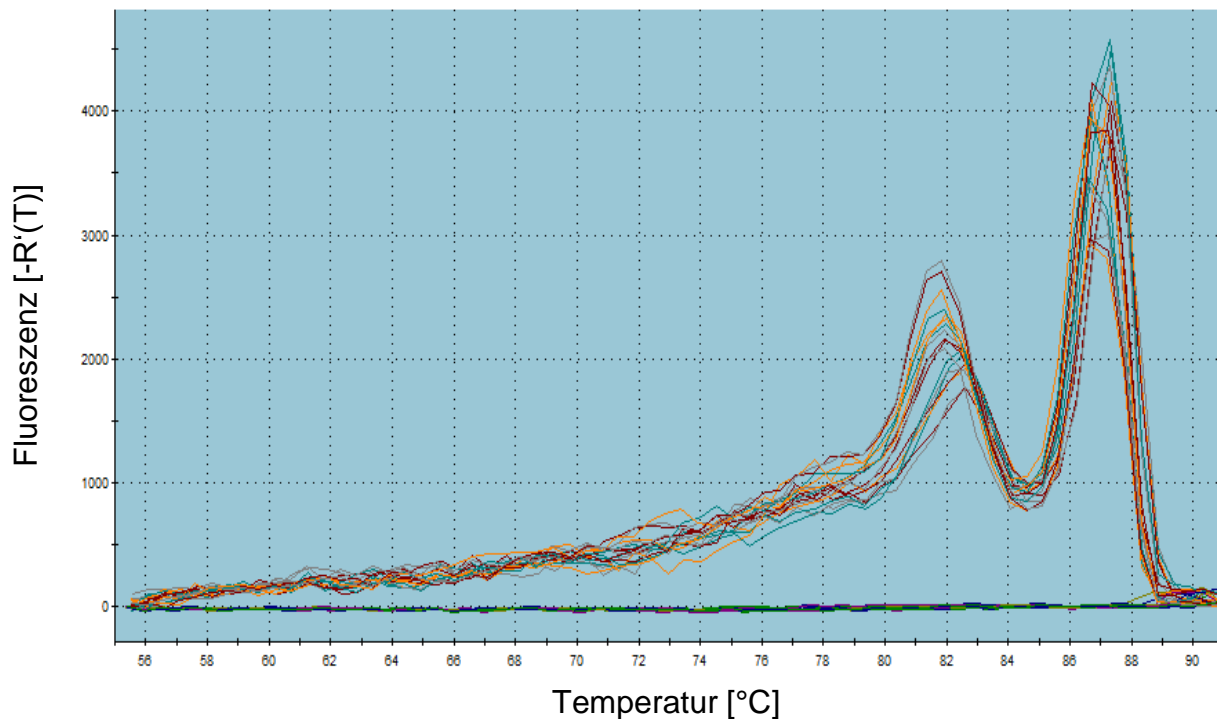
Für diese Vorauswahl an Genen wurden, wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben, jeweils 3-5 Primerpaare entworfen und mittels *real-time* PCR getestet. So konnte mittels *real-time* PCR die Schmelzkurve auf mögliche Bildung von Primerdimeren analysiert werden. Die Abbildungen 4.3 und 4.4 zeigen Beispiele solcher Schmelzkurven. Jedes positiv getestete Primerpaar wurde einer genauen Primereffizienzanalyse unterzogen. Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert, wobei sich bei nahezu allen Primerpaaren ein PCR-Produkt der errechneten Fragmentgröße fand.

Aufgrund dieser Analysen konnte für jedes zu untersuchende Gen ein geeignetes Primerpaar ausgewählt werden. In Tabelle 4.3 sind die jeweils effizientesten Primerpaare für jedes Gen mit den dazugehörigen Primereffizienzen aufgelistet. Diese Primerpaare wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.3:** Grafische Darstellung einer Schmelzkurve mit einem Schmelzpunkt, in diesem Fall von Primerpaar „CX3CR1 Primer B“. Für dieses Primerpaar wurde eine Primereffizienzanalyse durchgeführt. Dargestellt ist die Fluoreszenz als negative erste Ableitung in Abhängigkeit von der Temperatur.



**Abbildung 4.4:** Grafische Darstellung einer Schmelzkurve mit mehreren Schmelzpunkten, in diesem Fall von Primerpaar „Bcl-2 Primer B“. Dieses Primerpaar wurde nicht für eine Primereffizienzanalyse in Betracht gezogen. Dargestellt ist die Fluoreszenz als negative erste Ableitung in Abhängigkeit von der Temperatur.

## 4 Ergebnisse

**Tabelle 4.3:** Unter allen Primerpaaren wurden jene mit der optimalsten Primereffizienz für die weiteren Analysen ausgewählt. Die Tabelle zeigt eine Übersicht der ausgewählten Primerpaare, ihre Gensequenz sowie die Primereffizienz.

<b>Gensymbol</b>	<b>Gensequenz</b>	<b>Effizienz</b>
18S_s:	5'-AAACCAACCCGGTGAGCTCCCTCC-3'	101 %
18S_as:	5'-CGTGCGATCGGCCCGAGGTT-3'	
BDNF_s	5'-CCACCAGGTGAGAAGAGTGATGACCAT-3'	99 %
BDNF_as	5'-CCCTGGGCCCATTCACGCTC-3'	
CX3CR1_s	5'-TGTCCACCTCCTTCCCTGAACTGG-3'	100 %
CX3CR1_as	5'-CGAACGTGAAGACGAGGGCGT-3'	
GAPDH_s	5'-ACGGCCGCATCTTCTTGTC-3'	102 %
GAPDH_as	5'-CGGCCAAATCCGTTACACCGA-3'	
HPRT_s	5'-TGAGCCATTGCTGAGGCGGC-3'	101 %
HPRT_as	5'-CGCTAATCACGACGCTGGGACTG-3'	
NTRK2_s	5'-TCAGCGCCAACCTGCTCAGC-3'	105 %
NTRK2_as	5'-CCTGCGCCCTCTTGCTGCTT-3'	

Für den Nachweis des MasR bzw. des AT2R wurde ebenso verfahren. Da der Nachweis der Expression der Rezeptoren jedoch qualitativ erfolgte, war eine Primereffizienzanalyse nicht notwendig. Nach Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese zeigten sich die in Tabelle 4.4 zusammengefassten Primerpaare als geeignet.

**Tabelle 4.4:** Primer sowie ihre Gensequenz zum Nachweis des AT2R sowie des MasR.

<b>Gensymbol</b>	<b>Gensequenz</b>
MasR_s	5'-CTCTGGTTCCTCTGCTTCCG-3'
MasR_as	5'-CCTCTCCACACTGATGGCTG-3'
AT2R_s	5'-CTCACTGTTTTGTTGTC-3'
AT2R_as	5'-CAATGGTTCTGACATCC-3'

#### 4.1.2.3 Identifikation geeigneter Gene

Von allen untersuchten Genen stellte sich CX3CR1 als das Gen heraus, dessen Expression am deutlichsten reguliert war. So zeigten Astrozyten, welche mit dem MasR-Agonisten Ang-(1-7) oder dem AT2R-Agonisten C21 stimuliert worden waren, eine signifikante Erhöhung der CX3CR1-Expression. Die Gene BDNF, NTRK2 und Bcl-2 waren in ihrer Expression kaum oder nicht reguliert, so dass nach Abschluss der experimentellen Vorphase auf ihre Messung verzichtet wurde. HPRT erwies sich unter den Versuchsbedingungen als das am konstantesten exprimierte *Housekeeping*-Gen. Nach Etablierung aller Methoden wurden die Proben deshalb auf CX3CR1 untersucht und mittels HPRT normalisiert.

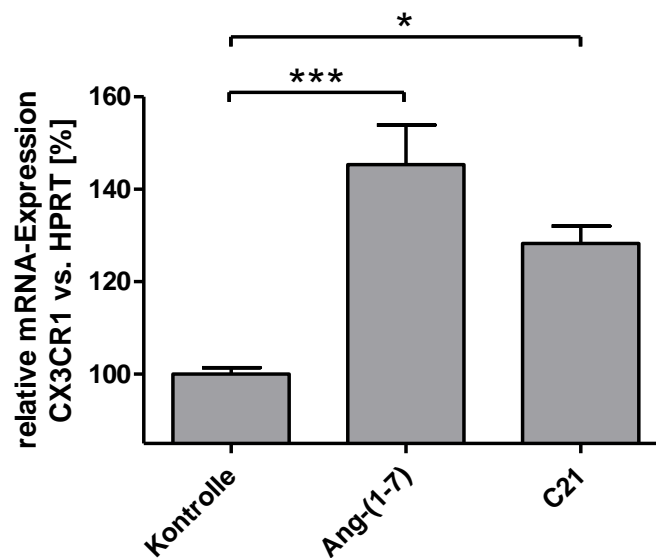
## 4.2 Wirkung und Rezeptorspezifität der verwendeten Substanzen

Parallel zu den Experimenten zur Rezeptorinteraktion wurden Versuche durchgeführt, welche die Wirkungen aller verwendeten Substanzen sowie die Spezifität der Agonisten am jeweiligen Rezeptor untersuchen sollten. Dabei wurde getestet, inwieweit

- die Rezeptorantagonisten eigenständige Effekte zeigten (Kapitel 4.2.2),
- die Ang-(1-7)-vermittelte Erhöhung der CX3CR1-Expression spezifisch über den Rezeptor Mas vermittelt wird (Kapitel 4.2.3) und
- die C21-vermittelte Erhöhung der CX3CR1-Expression spezifisch über den AT2-Rezeptor vermittelt wird (Kapitel 4.2.4).

#### 4.2.1 Rezeptoragonisten erhöhen CX3CR1-Expression

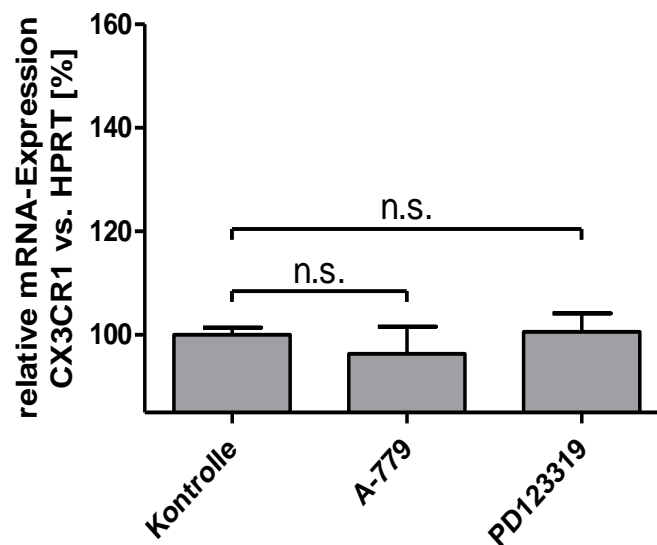
Sowohl die Stimulation des Rezeptors Mas mit Ang-(1-7) als auch die des AT2-Rezeptors mit C21 konnten die Transkription des Zielgens CX3CR1 induzieren. Hierbei konnte ein Anstieg der CX3CR1-mRNA um  $45,3 \pm 8,5$  % bzw. um  $28,3 \pm 3,7$  % gemessen werden.



**Abbildung 4.5:** Expressionsanalyse von CX3CR1 nach Stimulation des Rezeptors Mas oder des AT2-Rezeptors. Die graphische Darstellung zeigt die relative CX3CR1-mRNA-Expression normalisiert auf HPRT in primären, murinen Wildtyp-Astrozyten. Die mRNA-Expression wurde in unbehandelten Kontrollgruppen sowie nach 6-stündiger Inkubation mit Ang-(1-7) [MasR-Agonist, 1  $\mu$ M] oder C21 [AT2R-Agonist, 1  $\mu$ M] gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ), jede Messung erfolgte in technischen Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitiger Varianzanalyse, anschließend wurde eine bestehende Signifikanz durch die Bonferroni-Methode geprüft. Dabei steht \* für  $p < 0,05$  und \*\*\* für  $p < 0,001$ .

#### 4.2.2 Rezeptorantagonisten zeigen keinen eigenständigen Effekt

Für die Untersuchungen war es wichtig zu ermitteln, ob die Antagonisten einen eigenen Effekt auf das Zielgen haben. Hierfür wurden die Astrozyten mit A-779 (einem Antagonisten des MasR) oder PD123319 (einem Antagonisten des AT2R) inkubiert. Dies führte zu keinem signifikanten Effekt bezüglich der CX3CR1-mRNA-Expression ( $100,6 \pm 3,5$  % für A-779 und  $96,3 \pm 5,2$  % für PD123319).



**Abbildung 4.6:** Expressionsanalyse von CX3CR1 nach Inkubation mit Antagonisten des Rezeptors Mas und des AT2-Rezeptors. Die graphische Darstellung zeigt die relative CX3CR1-mRNA-Expression normalisiert auf HPRT in primären, murinen Wildtyp-Astrozyten. Die mRNA-Expression wurde in unbehandelten Kontrollgruppen sowie nach 7-stündiger Inkubation mit A-779 [MasR-Antagonist, 10  $\mu$ M] oder PD123319 [AT2R-Antagonist, 10  $\mu$ M] gemessen. Die Inkubationszeit von 7 Stunden für die Rezeptorantagonisten wurde analog zu den Spezifitäts- und Interaktionsexperimenten gewählt (siehe Kapitel 4.2.3 bis 4.3.3) und ergibt sich aus der Summe 60-minütigen Vorinkubation mit dem Antagonisten und der darauf folgenden 6-stündigen Inkubationszeit mit Agonisten. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ), jede Messung erfolgte in technischen Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitiger Varianzanalyse. Dabei steht n.s. für nicht signifikant.

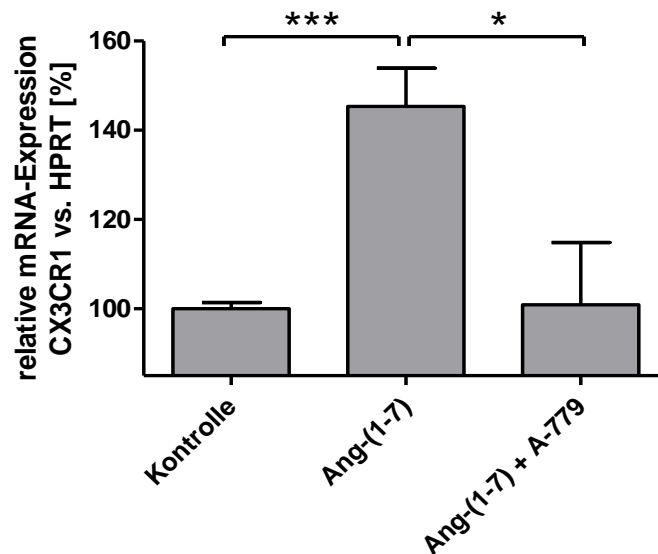
### **4.2.3 Die Effekte des MasR-Agonisten sind spezifisch für den MasR**

In den beiden folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die nachgewiesenen Effekte des MasR-Agonisten Angiotensin-(1-7) über den Rezeptor Mas vermittelt wurden. Hierzu wurden zwei Untersuchungen durchgeführt. Zum einen wurde getestet, ob sich der Effekt von Angiotensin-(1-7) durch den Mas-Rezeptor-spezifischen Antagonisten A-779 inhibieren lässt. Tatsächlich konnte A-779 den Effekt von Angiotensin-(1-7) signifikant reduzieren. Die Ergebnisse finden sich in Kapitel 4.2.3.1.

Zum anderen wurde geprüft, ob der Effekt von Angiotensin-(1-7) in Mas-Rezeptor-Knockout-Zellen ebenfalls vorhanden ist. Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse findet sich in Kapitel 4.2.3.2. Es konnte festgestellt werden, dass Angiotensin-(1-7) in Mas-Rezeptor-Knockout-Zellen keinen Effekt zeigt.

#### 4.2.3.1 Der MasR-Antagonist hemmt den Effekt des MasR-Agonisten

Durch den MasR-Antagonisten A-779 wird der Effekt des MasR-Agonisten Ang-(1-7) signifikant von  $145,3 \pm 8,5\%$  auf  $100,9 \pm 14,0\%$  reduziert.

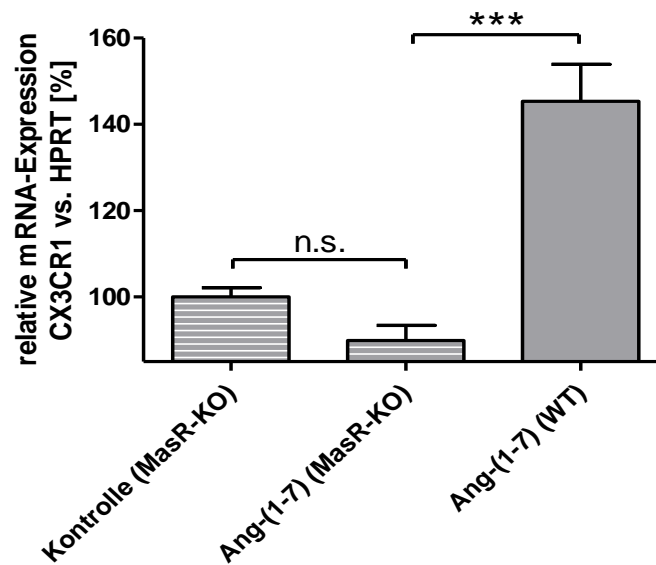


**Abbildung 4.7:** Expressionsanalyse von CX3CR1 nach Stimulation des Rezeptors Mas mit und ohne MasR-Antagonist. Die graphische Darstellung zeigt die relative CX3CR1-mRNA-Expression normalisiert auf HPRT in primären, murinen Wildtyp-Astrozyten. Die mRNA-Expression wurde in unbehandelten Kontrollgruppen sowie nach 6-stündiger Inkubation mit Ang-(1-7) [MasR-Agonist, 1  $\mu$ M] allein oder plus A-779 [MasR-Antagonist, 10  $\mu$ M] gemessen. A-779 wurde hierbei 60 Minuten vor Ang-(1-7) zugegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ), jede Messung erfolgte in technischen Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test für unabhängige Stichproben. Dabei steht \* für  $p < 0,05$  und \*\*\* für  $p < 0,001$ .



#### 4.2.3.2 Der MasR-Agonist zeigt in MasR-KO-Astrozyten keinen Effekt

In Mas-Rezeptor-defizienten Astrozyten ist der Effekt des MasR-Agonisten Ang-(1-7) nicht signifikant verschieden von unbehandelten Kontrollen ( $100,0 \pm 2,1\%$  vs.  $89,9 \pm 3,5\%$ ).



**Abbildung 4.8:** Expressionsanalyse von CX3CR1 nach Stimulation des Rezeptors Mas in Wildtyp- und MasR-Knockout-Astrozyten der Maus. Die graphische Darstellung zeigt die relative CX3CR1-mRNA-Expression normalisiert auf HPRT. Die quergestreiften Balken stehen für Experimente in MasR-KO-Astrozyten, die ungemusterten, grauen Balken für Wildtyp-Experimente. Die mRNA-Expression wurde in unbehandelten Kontrollgruppen sowie nach 6-stündiger Inkubation mit Ang-(1-7) [MasR-Agonist, 1  $\mu$ M] gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ), jede Messung erfolgte in technischen Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test für unabhängige Stichproben. Dabei steht n.s. für nicht signifikant und \*\*\* für  $p < 0,001$ .

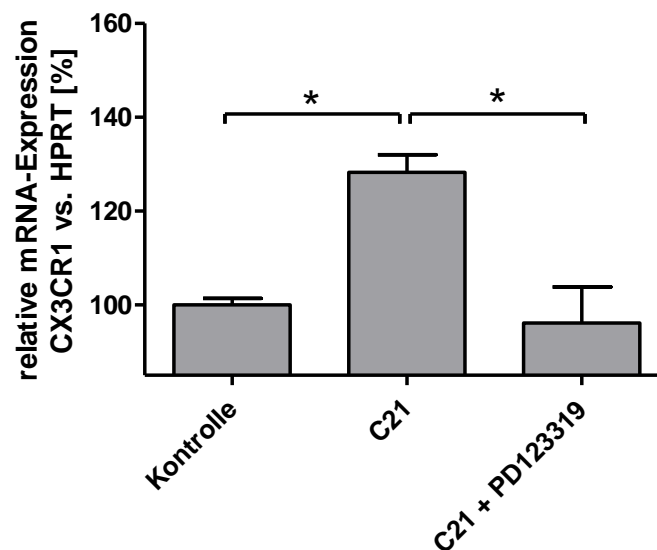
### **4.2.4 Die Effekte des AT2R-Agonisten sind spezifisch für den AT2R**

Analog zu Angiotensin-(1-7) war es auch für *C21* essentiell aufzuzeigen, ob die hervorgerufenen Effekte über den AT2-Rezeptor vermittelt wurden. Hierfür wurden zwei Untersuchungen durchgeführt. Zum einen wurde getestet, ob sich der Effekt von *C21* durch den AT2-Rezeptor-Antagonisten PD123319 aufheben lässt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen können in Kapitel 4.2.4.1 eingesehen werden. Es zeigte sich, dass PD123319 in der Lage war, die *C21*-induzierten Effekte zu inhibieren.

Zum anderen wurde untersucht, ob sich der Effekt von *C21* auch in AT2-Rezeptor-Knockout-Zellen nachweisen lässt. In Kapitel 4.2.4.2 findet sich die Darstellung dieser Versuche an AT2R-defizienten Astrozyten. In diesen Zellen ohne funktionsfähigen AT2R hatte *C21* keinen Effekt auf die CX3CR1-mRNA-Expression.

#### 4.2.4.1 Der AT2R-Antagonist hemmt den Effekt des AT2R-Agonisten

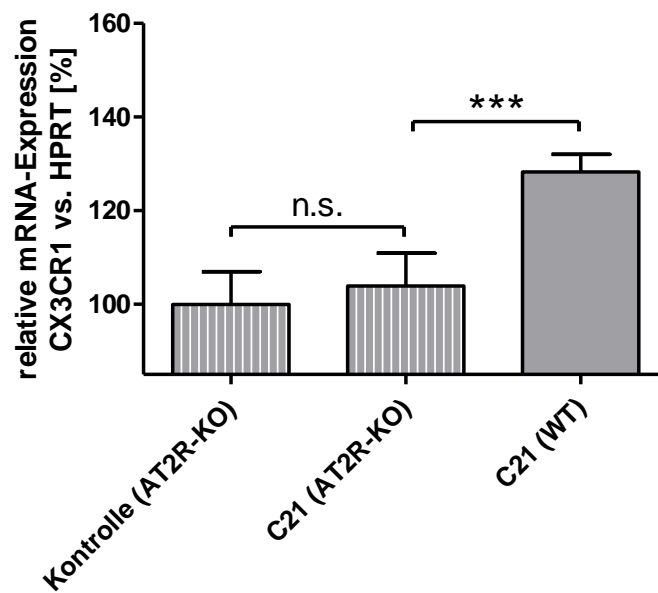
Durch den AT2R-Antagonisten PD123319 konnte der Effekt des AT2R-Agonisten *C21* signifikant von  $128,3 \pm 3,7\%$  auf  $96,1 \pm 7,7\%$  reduziert werden.



**Abbildung 4.9:** Expressionsanalyse von CX3CR1 nach Stimulation des AT2-Rezeptors mit und ohne AT2R-Antagonist. Die graphische Darstellung zeigt die relative CX3CR1-mRNA-Expression normalisiert auf HPRT in primären, murinen Wildtyp-Astrozyten. Die mRNA-Expression wurde in unbehandelten Kontrollgruppen sowie nach 6-stündiger Inkubation mit *C21* [AT2R-Agonist, 1  $\mu$ M] allein oder plus PD123319 [AT2R-Antagonist, 10  $\mu$ M] gemessen. PD123319 wurde hierbei 60 Minuten vor *C21* zugegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ), jede Messung erfolgte in technischen Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test für unabhängige Stichproben. Dabei steht \* für  $p < 0,05$ .

#### 4.2.4.2 Der AT2R-Agonist zeigt in AT2R-KO-Astrozyten keinen Effekt

In AT2-Rezeptor-defizienten Astrozyten ist der Effekt des AT2R-Agonisten C21 nicht signifikant verschieden von unbehandelten Kontrollen ( $100,0 \pm 7,0\%$  vs.  $103,9 \pm 7,0\%$ ).

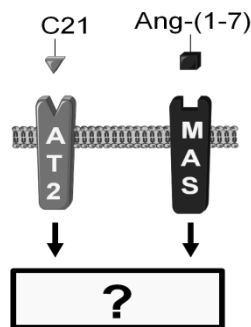


**Abbildung 4.10:** Expressionsanalyse von CX3CR1 nach Stimulation des AT2-Rezeptors in Wildtyp- und AT2R-Knockout-Astrozyten der Maus. Die graphische Darstellung zeigt die relative CX3CR1-mRNA-Expression normalisiert auf HPRT. Die längsgestreiften Balken stehen für Experimente in AT2R-KO-Astrozyten, die ungemusterten, grauen Balken für Wildtyp-Experimente. Die mRNA-Expression wurde in unbehandelten Kontrollgruppen sowie nach 6-stündiger Inkubation mit C21 [AT2R-Agonist, 1  $\mu$ M] gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ), jede Messung erfolgte in technischen Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test für unabhängige Stichproben. Dabei steht n.s. für nicht signifikant und \*\*\* für  $p < 0,001$ .

### 4.3 Experimente zur Interaktion von MasR und AT2R

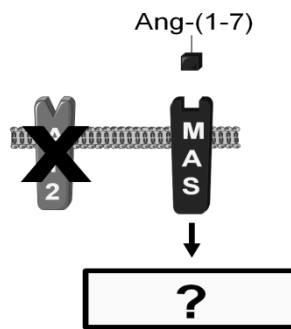
Die Auswertung der Experimente zur Wirkung und Rezeptorspezifität der verwendeten Substanzen belegt, dass mit der CX3CR1-kodierenden mRNA ein Marker gefunden war, der zur Bestimmung der Rezeptoraktivität dienen kann. Aufbauend darauf wurden Experimente zur Interaktion beider Rezeptoren durchgeführt. Hierzu wurden drei Fragestellungen definiert und näher untersucht.

**Fragestellung 1** untersucht mögliche synergistische Effekte zwischen beiden Rezeptoren. Es wurde untersucht, welchen Effekt die gleichzeitige Aktivierung beider Rezeptoren hat. Eine Potenzierung oder Addition der Einzeleffekte wäre denkbar gewesen. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4.3.1 zusammengefasst.



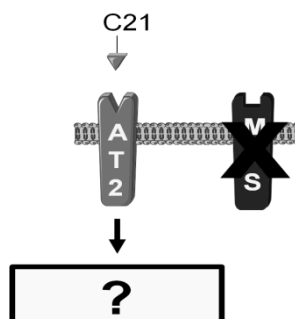
**Abbildung 4.11:** Schematische Darstellung der Effekte einer Kostimulation beider Rezeptoren mit Ang-(1-7) und C21.

**Fragestellung 2** prüft die Funktion des Rezeptors Mas nach funktioneller Inaktivierung des AT2-Rezeptors. Die Inaktivierung erfolgte zum einen durch Antagonisierung des AT2-Rezeptors mit dem AT2-Rezeptor-Antagonisten PD123319. Zum anderen wurden Experimente in AT2-Rezeptor-Knockout-Astrozyten durchgeführt. Die Ergebnisse finden sich in Kapitel 4.3.2.



**Abbildung 4.12:** Schematische Darstellung der Effekte von Ang-(1-7) unter AT2-Rezeptor-Inaktivierung.

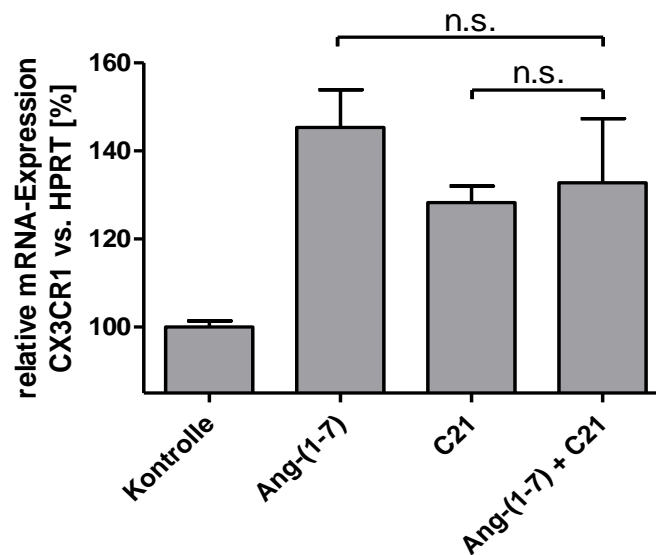
**Fragestellung 3** analysiert die AT2-Rezeptor-Funktion nach Inhibition des Rezeptors Mas. Wiederum wurden zwei Möglichkeiten zur Rezeptor-Inaktivierung genutzt, einerseits die Antagonisierung mit dem Mas-Rezeptor-Antagonisten A-779 und andererseits der Einsatz MasR-defizienter Astrozyten. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4.3.3 dargestellt.



**Abbildung 4.13:** Schematische Darstellung der Effekte von C21 unter Mas-Rezeptor-Inaktivierung.

### 4.3.1 Kein additiver Synergismus bei Kostimulation von MasR und AT2R

Die zeitgleiche Stimulation beider Rezeptoren führte zu keiner weiteren Erhöhung der CX3CR1-Expression. Vielmehr waren die mRNA-Konzentrationen von CX3CR1 vergleichbar mit der Einzelstimulation der Rezeptoren ( $132,8 \pm 14,6\%$  unter Kostimulation vs.  $145,3 \pm 8,5\%$  unter Ang-(1-7)-Stimulation oder  $128,3 \pm 3,7\%$  unter C21-Stimulation).



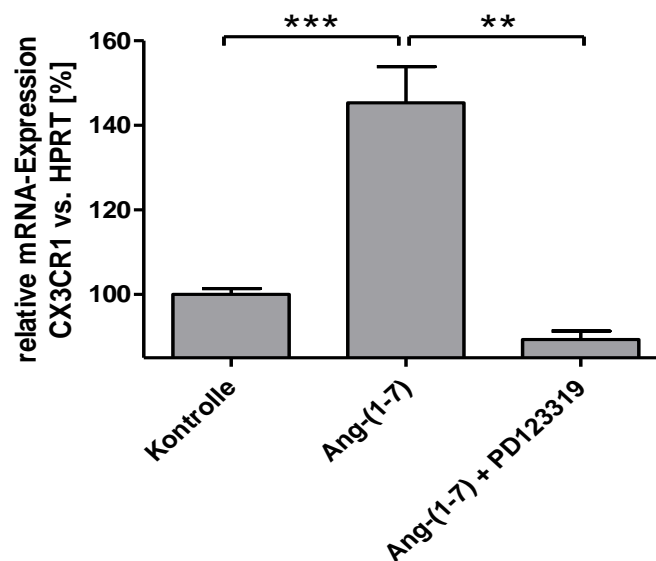
**Abbildung 4.14:** Expressionsanalyse von CX3CR1 nach Stimulation des AT2-Rezeptors und des Rezeptors Mas. Die graphische Darstellung zeigt die relative CX3CR1-mRNA-Expression normalisiert auf HPRT in primären, murinen Wildtyp-Astrozyten. Die mRNA-Expression wurde in unbehandelten Kontrollgruppen sowie nach 6-stündiger Inkubation mit Ang-(1-7) [MasR-Agonist, 1  $\mu$ M] oder C21 [AT2R-Agonist, 1  $\mu$ M] oder Ang-(1-7) plus C21 [MasR-Agonist plus AT2R-Agonist, je 1  $\mu$ M] gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ), jede Messung erfolgte in technischen Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitiger Varianzanalyse, anschließend wurde eine bestehende Signifikanz durch die Bonferroni-Methode geprüft. Dabei steht n.s. für nicht signifikant.

### 4.3.2 Gehemmte MasR-Funktion durch funktionelle Inaktivierung des AT2R

Zur Untersuchung der Funktion des Rezeptors Mas nach funktioneller Inaktivierung des AT2-Rezeptors wurden zwei Experimente durchgeführt. In beiden Versuchen wurde zunächst der AT2-Rezeptor inaktiviert und anschließend der Rezeptor Mas mit Angiotensin-(1-7) stimuliert.

#### 4.3.2.1 AT2R-Antagonisierung hemmt die MasR-Funktion

Im ersten Experiment wurde der AT2-Rezeptor pharmakologisch durch den AT2-Rezeptor-Antagonisten PD123319 inaktiviert. Die Ang-(1-7)-Wirkung wurde durch PD123319 signifikant reduziert ( $89,4 \pm 2,0\%$  vs.  $145,3 \pm 8,5\%$ ).

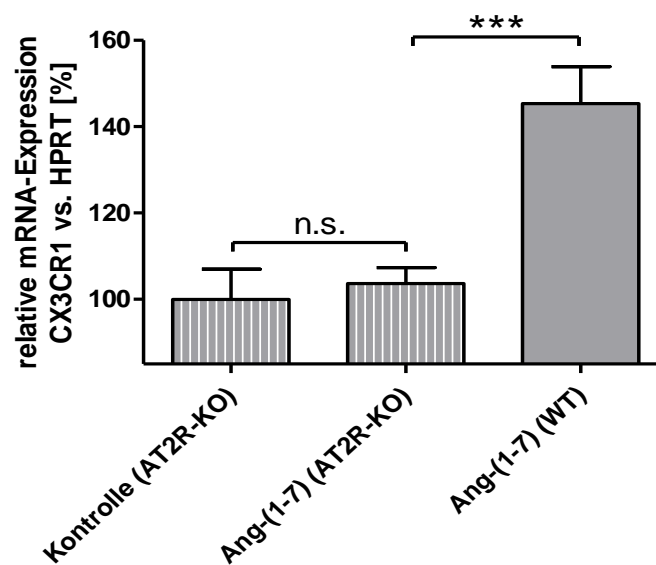


**Abbildung 4.15:** Expressionsanalyse von CX3CR1 nach Stimulation des Rezeptors Mas mit und ohne AT2R-Antagonist. Die graphische Darstellung zeigt die relative CX3CR1-mRNA-Expression normalisiert auf HPRT in primären, murinen Wildtyp-Astrozyten. Die mRNA-Expression wurde in unbehandelten Kontrollgruppen sowie nach 6-stündiger Inkubation mit Ang-(1-7) [MasR-Agonist, 1  $\mu$ M] allein oder plus PD123319 [AT2R-Antagonist, 10  $\mu$ M] gemessen. PD123319 wurde hierbei 60 Minuten vor Ang-(1-7) zugegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ), jede Messung erfolgte in technischen Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test für unabhängige Stichproben. Dabei steht \*\* für  $p < 0,01$  und \*\*\* für  $p < 0,001$ .



#### 4.3.2.2 Gehemmte MasR-Funktion in AT2R-KO-Astrozyten

Die Funktion des Rezeptors Mas wurde bei AT2R-Defizienz getestet. Die Mas-Rezeptor-Funktion ist hierbei signifikant gehemmt. Die Expression von CX3CR1 nach Stimulation AT2R-defizienter Zellen mit dem Mas-Rezeptor-Agonisten Ang-(1-7) ( $103,7 \pm 3,7\%$ ) ist vergleichbar mit der Expression der Kontrollgruppe ( $100,0 \pm 7,0\%$ ).



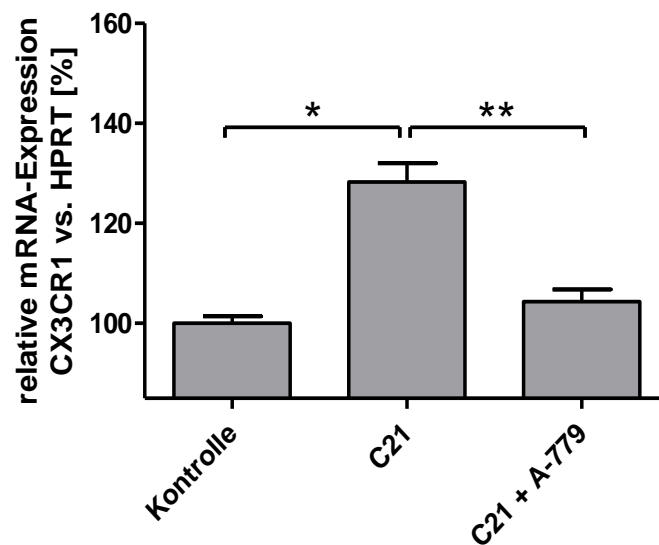
**Abbildung 4.16:** Expressionsanalyse von CX3CR1 nach Stimulation des Rezeptors Mas in Wildtyp- und AT2R-Knockout-Astrozyten der Maus. Die graphische Darstellung zeigt die relative CX3CR1-mRNA-Expression normalisiert auf HPRT. Die längsgestreiften Balken stehen für Experimente in AT2R-KO-Astrozyten, die ungemusterten, grauen Balken für Wildtyp-Experimente. Die mRNA-Expression wurde in unbehandelten Kontrollgruppen sowie nach 6-stündiger Inkubation mit Ang-(1-7) [MasR-Agonist, 1  $\mu$ M] gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ), jede Messung erfolgte in technischen Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test für unabhängige Stichproben. Dabei steht n.s. für nicht signifikant und \*\*\* für  $p < 0,001$ .

### 4.3.3 Funktionelle Inaktivierung des MasR hemmt die AT2R-Funktion

Zur Untersuchung der AT2R -Funktion bei funktioneller Inaktivierung des MasR wurden zwei Experimente durchgeführt. In beiden wurde zunächst der Rezeptor Mas inaktiviert und anschließend die Funktion des AT2-Rezeptors mit C21 überprüft.

#### 4.3.3.1 MasR-Antagonisierung hemmt die AT2R-Funktion

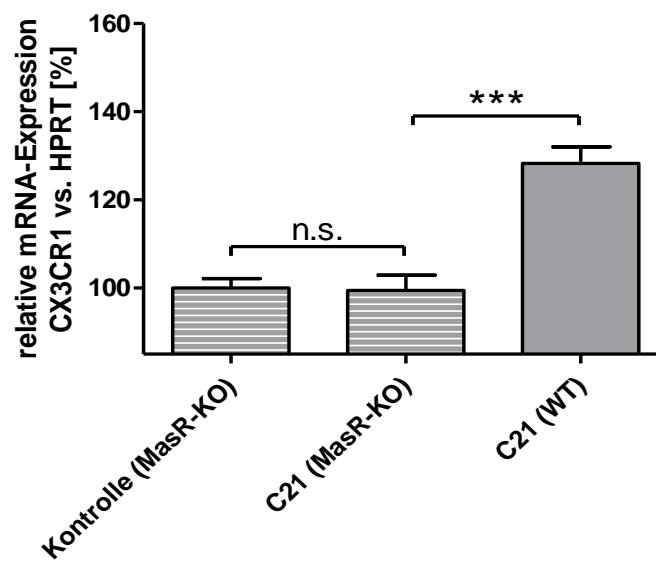
Der Rezeptor Mas wurde pharmakologisch mithilfe des Mas-Rezeptor-Antagonisten A-779 inaktiviert. A-779 führte zu einer signifikanten Reduktion des AT2-Rezeptor-effekts ( $128,3 \pm 3,7\%$  vs.  $104,5 \pm 2,5\%$ ). Dies legt nahe, dass die Antagonisierung des Rezeptors Mas die AT2-Rezeptor-Funktion hemmt.



**Abbildung 4.17:** Expressionsanalyse von CX3CR1 nach Stimulation des AT2-Rezeptors mit und ohne MasR-Antagonist. Die graphische Darstellung zeigt die relative CX3CR1-mRNA-Expression normalisiert auf HPRT in primären, murinen Wildtyp-Astrozyten. Die mRNA-Expression wurde in unbehandelten Kontrollgruppen sowie nach 6-stündiger Inkubation mit C21 [AT2R-Agonist, 1  $\mu$ M] allein oder plus A-779 [MasR-Antagonist, 10  $\mu$ M] gemessen. A-779 wurde hierbei 60 Minuten vor C21 zugegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ), jede Messung erfolgte in technischen Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test für unabhängige Stichproben. Dabei steht \* für  $p < 0,05$  und \*\* für  $p < 0,01$ .

#### 4.3.3.2 Gehemmte AT2R-Funktion in MasR-KO-Astrozyten

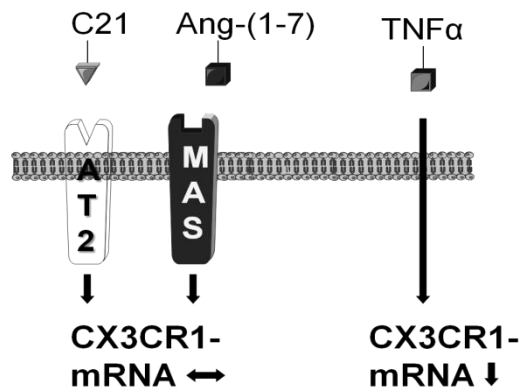
Im zweiten Experiment wurde die Stimulation des AT2-Rezeptors nach Knockout des Rezeptors Mas geprüft. Hierbei war der Effekt des AT2R-Agonisten *C21* auf das Zielgen *CX3CR1* im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen signifikant reduziert. Die mRNA-Level von  $99,5 \pm 3,4 \%$  sind vergleichbar mit denen der Kontrollgruppe ( $100,0 \pm 2,1 \%$ ).



**Abbildung 4.18:** Expressionsanalyse von *CX3CR1* nach Stimulation des AT2-Rezeptors in Wildtyp- und MasR-Knockout-Astrozyten der Maus. Die graphische Darstellung zeigt die relative *CX3CR1*-mRNA-Expression normalisiert auf *HPRT*. Die quergestreiften Balken stehen für Experimente in MasR-KO-Astrozyten, die ungemusterten, grauen Balken für Wildtyp-Experimente. Die mRNA-Expression wurde in unbehandelten Kontrollgruppen sowie nach 6-stündiger Inkubation mit *C21* [AT2R-Agonist, 1  $\mu$ M] gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ), jede Messung erfolgte in technischen Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test für unabhängige Stichproben. Dabei steht n.s. für nicht signifikant und \*\*\* für  $p < 0,001$ .

#### 4.3.4 TNF $\alpha$ als Positivkontrolle

In den Knockout-Astrozyten konnte eine Stimulation mit Rezeptoragonisten jeweils keinen Effekt auslösen – weder der Agonist des funktionell defizienten Rezeptors noch der Agonist des vorhandenen Rezeptors führten zu einer Änderung der CX3CR1-Expression. Die mit den Agonisten inkubierten Astrozyten waren somit vergleichbar mit den unbehandelten Kontrollgruppen. Um nachzuweisen, dass das Modell dennoch geeignet ist, Unterschiede der CX3CR1-Expression in den Knockout-Astrozyten zu detektieren, wurde TNF $\alpha$  als Positivkontrolle eingeführt. Die Experimente in den Knockout-Astrozyten wurden unter Mitführung der Positivkontrolle wiederholt.

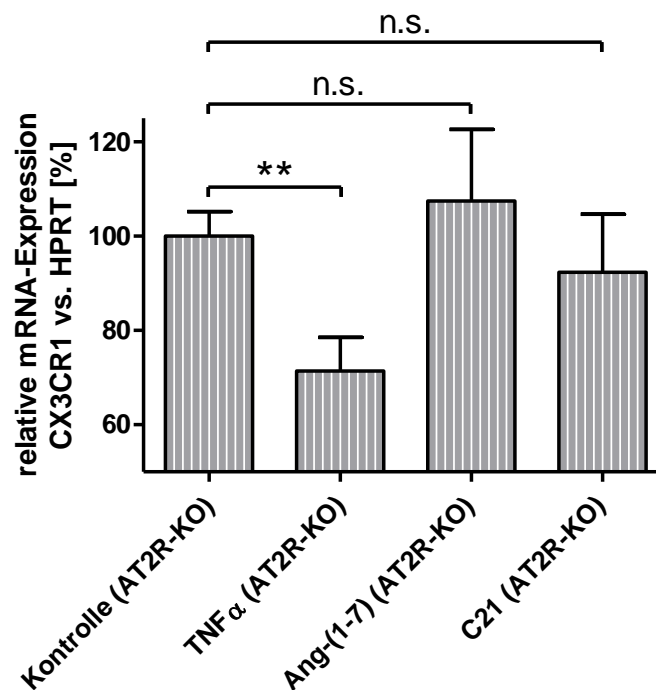


**Abbildung 4.19:** Schematische Darstellung der Effekte von TNF $\alpha$  auf die CX3CR1-mRNA-Expression am Beispiel von AT2R-KO-Zellen.

Die 6-stündige Inkubation mit TNF $\alpha$  führte zu einer signifikanten Regulation der CX3CR1-Expression. Die Resultate der Stimulationsversuche mit Ang-(1-7) bzw. C21 waren dabei mit den Vorversuchen vergleichbar.

#### 4.3.4.1 TNF $\alpha$ in AT2R-KO-Astrozyten

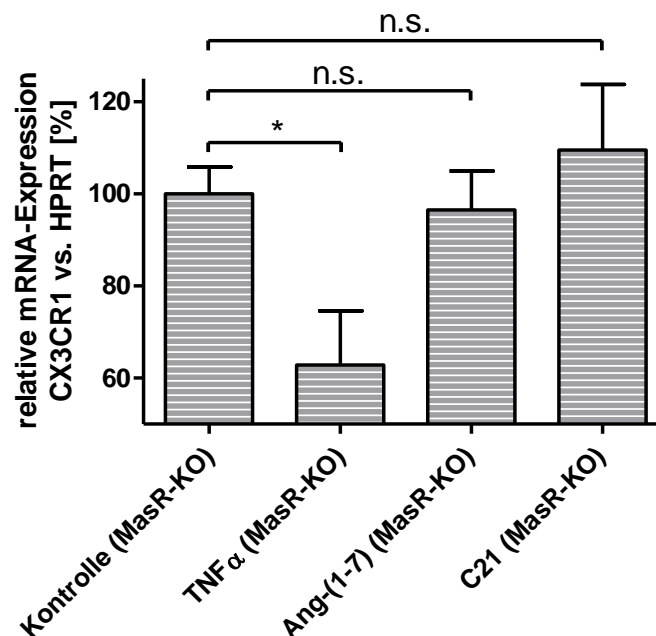
In AT2R-Knockout Astrozyten führte die Inkubation mit TNF $\alpha$  zu einer sehr signifikanten Reduktion der CX3CR1-Expression ( $100,0 \pm 5,2\%$  in der Kontrollgruppe vs.  $71,4 \pm 7,2\%$  in der TNF $\alpha$ -Gruppe). Die Werte unter Stimulation des Rezeptors Mas mit Ang-(1-7) oder des AT2-Rezeptors mit C21 unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe. ( $100,0 \pm 5,2\%$  in der Kontrollgruppe vs.  $107,5 \pm 15,2\%$  unter Stimulation mit Ang-(1-7) und  $92,4 \pm 12,3\%$  unter C21-Stimulation). Die Ergebnisse sind damit übereinstimmend mit den Vorversuchen (siehe Kapitel 4.2.4.2 und 4.3.2.2).



**Abbildung 4.20:** Expressionsanalyse von CX3CR1 nach Inkubation mit TNF $\alpha$  in AT2R-Knockout-Astrozyten der Maus. Die graphische Darstellung zeigt die relative CX3CR1-mRNA-Expression normalisiert auf HPRT. Die mRNA-Expression wurde in unbehandelten Kontrollgruppen sowie nach 6-stündiger Inkubation mit TNF $\alpha$  [10 ng/ $\mu$ l], Ang-(1-7) [MasR-Agonist, 1  $\mu$ M] oder C21 [AT2R-Agonist, 1  $\mu$ M] gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ), jede Messung erfolgte in technischen Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test für unabhängige Stichproben. Dabei steht n.s. für nicht signifikant und \*\* für  $p < 0,01$ .

#### 4.3.4.2 TNF $\alpha$ in MasR-KO-Astrozyten

Auch in Mas-Rezeptor-defizienten Astrozyten führte die Inkubation mit TNF $\alpha$  zu einer signifikanten Regulation der CX3CR1-Expression ( $100,0 \pm 5,9\%$  in der Kontrollgruppe vs.  $62,9 \pm 11,7\%$  in der TNF $\alpha$ -Gruppe). Den vorangegangenen Testreihen (siehe Kapitel 4.2.3.2 und 4.3.3.2) entsprechend, kam es unter Stimulation des Rezeptors Mas oder des AT2-Rezeptors zu keiner signifikanten Expressionsänderung von CX3CR1 ( $96,5 \pm 8,4\%$  unter Ang-(1-7) und  $109,5 \pm 14,3\%$  unter C21-Stimulation).



**Abbildung 4.21:** Expressionsanalyse von CX3CR1 nach Inkubation mit TNF $\alpha$  in MasR-Knockout-Astrozyten der Maus. Die graphische Darstellung zeigt die relative CX3CR1-mRNA-Expression normalisiert auf HPRT. Die mRNA-Expression wurde in unbehandelten Kontrollgruppen sowie nach 6-stündiger Inkubation mit TNF $\alpha$  [10 ng/ $\mu$ l], Ang-(1-7) [MasR-Agonist, 1  $\mu$ M] oder C21 [AT2R-Agonist, 1  $\mu$ M] gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ), jede Messung erfolgte in technischen Triplikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test für unabhängige Stichproben. Dabei steht n.s. für nicht signifikant und \* für  $p < 0,05$ .

## 5 Diskussion

### 5.1 Identifizierung von funktioneller Interaktion zwischen AT2R und MasR in primären, murinen Astrozyten

Die beiden Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (AT2R) und Rezeptor Mas (MasR) stellen maßgebliche Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems dar und gelten aufgrund ihrer protektiven Wirkung bezüglich kardio- und zerebrovaskulärer Erkrankungen als wichtige Schwerpunkte der Herz-Kreislauf-Forschung. Die vorliegende Arbeit untersucht die Interaktion zwischen beiden Rezeptoren. Es konnte gezeigt werden, dass Stimulation des AT2R mit dem AT2R-Agonisten *Compound 21 (C21)* in kultivierten, primären Mausastrozyten zu einer vermehrten Expression des Chemokinrezeptors CX3CR1 führt. Dieser Effekt scheint spezifisch durch den AT2R vermittelt zu sein, da der Effekt nicht in Astrozyten auslösbar ist, welche:

- mit AT2R-Antagonisten vorinkubiert wurden
- keinen funktionsfähigen AT2R exprimieren (AT2R-Knockout).

Eine Hemmung dieses AT2R spezifischen Effektes erfolgt jedoch auch durch Inhibition des MasR, d.h. durch Knockout des MasR oder Vorinkubation mit MasR-Antagonisten. Diese Beobachtung ist neu und wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Ebenso verhält es sich mit dem Rezeptor Mas, dessen Agonist Angiotensin-(1-7) (kurz: Ang-(1-7)) zu einer Erhöhung der CX3CR1 Expression führt. Diese Wirkung des MasR-Agonisten Ang-(1-7) ist MasR-spezifisch, da sie aufgehoben wird durch:

- Vorinkubation mit MasR-Antagonisten
- Defizienz des MasR (MasR-Knockout).

Die Effekte des MasR-Agonisten können jedoch ebenso durch funktionelle Inaktivierung des AT2R-Rezeptors gehemmt werden. Werden beide Rezeptoren zeitgleich mit ihren jeweiligen Agonisten stimuliert, ist der Effekt vergleichbar mit der Einzelstimulation. Bereits mehrere Autoren hatten die Möglichkeit einer Interaktion beider Rezeptoren in Er-

wägung gezogen.<sup>76,82,83,92</sup> Die vorliegende Arbeit ist die erste systematische Untersuchung hierzu. Die Ergebnisse zeigen eine Transinhibition und fehlenden additiven Synergismus und legen nahe, dass sich beide Rezeptoren in ihrer Funktion maßgeblich beeinflussen.

## 5.2 CX3CR1-mRNA-Expression in Astrozyten

### 5.2.1 Primärzellkulturen von Astrozyten der Maus

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in Primärkulturen von neonatalen, murinen Astrozyten durchgeführt.

#### 5.2.1.1 Primäre Zellen zur Untersuchung möglicher Rezeptorinteraktionen

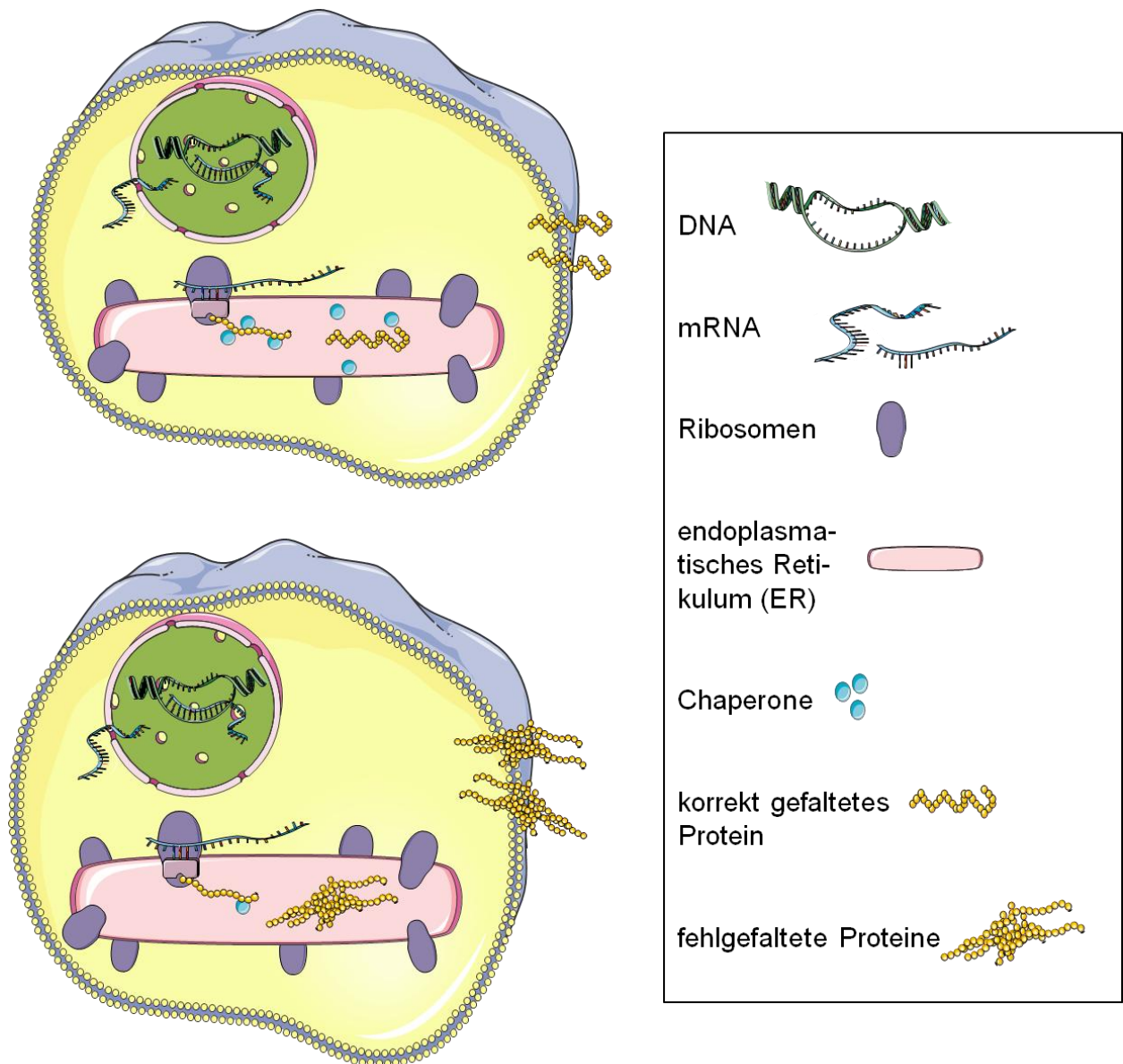
Für die Experimente dieser Arbeit wurden Primärkulturen gewählt. Grund dafür waren Erkenntnisse von Abd Alla et al., wonach Zelllinien mit transfizierten Rezeptoren die Rezeptorinteraktionen negativ beeinflussen können.<sup>93,94</sup> Abbildung 5.1 zeigt eine vereinfachte schematische Darstellung von Rezeptorinteraktionen und intrazellulärer Proteinfaltung sowohl in Primärkulturen als auch in Zelllinien. So exprimieren Zelllinien durch die Transfektion eine erheblich höhere Menge an Rezeptorprotein als im natürlichen Zustand. Dementsprechend kann nicht garantiert werden, dass die Zelllinie mit der für die korrekte Faltung der Proteine notwendigen Menge an Chaperonen ausgestattet ist. Chaperone sind intrazelluläre Proteine, welche die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine sicherstellen. Bleibt eine korrekte Faltung durch die Chaperone aus, bilden sich häufig funktionell inaktive Rezeptorproteinaggregate. Proteininteraktionen wie Rezeptordimerisierungen sind jedoch stark von der Raumstruktur der Rezeptoren abhängig. Ein mangelndes Vorhandensein der notwendigen Chaperone in Zelllinien könnte folglich zu Verfälschungen bezüglich der Rezeptorinteraktion führen.<sup>93,94</sup>

Abd Alla et al. konnten zeigen, dass HEK293-Zelllinien, welche mit dem Bradykinin-B2-Rezeptor transfiziert wurden, eine unreife Form dieses Rezeptors exprimierten. Das Vorkommen des unreifen Rezeptorproteins war auf eine unzureichende Menge an funk-



tionsfähigen Chaperonen zurückzuführen und führte zu einer veränderten Interaktion mit dem Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1.<sup>93,94</sup>

Um dies zu umgehen wurden für die vorliegende Arbeit Primärzellen verwendet, welche die beiden zu untersuchenden Rezeptoren natürlicherweise exprimieren (siehe Kapitel 4.1.1 und Fogarthy et al.<sup>90,91</sup>).



**Abbildung 5.1:** Vereinfachte schematische Darstellung des Einflusses von Chaperonen auf die Proteinfaltung nach Wagstaff et al.<sup>95</sup> Die obere Abbildung zeigt eine Zelle mit einem ausgeglichenen Protein-Chaperon-Verhältnis. Die Chaperone sorgen für eine korrekte Faltung der Proteine. Die untere Abbildung zeigt eine Situation, wie sie durch Transfektion einer Zelllinie mit einem Protein entstehen kann. Dieser Zelle fehlt eine ausreichende Anzahl von Chaperonen, was zu einer Fehlfaltung der Proteine führt.

### 5.2.1.2 Die Bedeutung von Astrozyten als kultivierte Hirnzellen zur Erforschung des Renin-Angiotensin-Systems

Das zentrale Nervensystem (ZNS) spielt für das im Blut zirkulierende, systemische Renin-Angiotensin-System (RAS) eine wichtige Rolle. Alle für das RAS wichtigen Rezeptoren sind im Hirn vorhanden, wobei der Rezeptor Mas im ZNS besonders stark exprimiert wird.<sup>96-99</sup> Zusätzlich verfügt das Hirn über ein eigenständiges lokales Renin-Angiotensin-System.<sup>100,101</sup> Dieses zerebrale Renin-Angiotensin-System ist wesentlich an der Regulation verschiedener Kreislauffunktionen beteiligt. Zudem konnten jüngste Forschungsergebnisse eine maßgebliche Beteiligung des zerebralen RAS bei der Entstehung und im Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Alzheimer-Demenz nachweisen.<sup>14,102-104</sup> Die Erforschung des RAS im zentralen Nervensystem nimmt dementsprechend einen hohen Stellenwert ein.

Kultivierte Hirnzellen wie Astrozyten gelten dabei als etabliertes Modell zur Erforschung des zerebralen RAS.<sup>105-107</sup> Astrozyten sind nicht nur zahlenmäßig der häufigste Zelltyp im Hirn, sie sind vielmehr in nahezu alle Funktionen des ZNS involviert. So unterstützen sie unter anderem die Erregungsleitung über Synapsen sowie den neuronalen Stoffwechsel und sind entscheidend an der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke sowie des Flüssigkeits- und Elektrolytgleichgewichtes beteiligt.<sup>108,109</sup> Wie bereits publiziert, exprimieren primäre Astrozytenkulturen sowohl den Rezeptor Mas als auch den AT2-Rezeptor.<sup>90,91</sup> Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Untersuchung der mRNA-Expression beider Rezeptoren verifiziert (siehe Kapitel 4.1.1).

## 5.2.2 CX3CR1-mRNA-Expression nach Rezeptorstimulation

### 5.2.2.1 Genexpressionanalysen mittels *real-time* PCR

Ziel dieser Arbeit war es gewesen, die Interaktionen zwischen dem Rezeptor Mas und dem AT2-Rezeptor möglichst direkt nachzuweisen. Zahlreiche Arbeiten, die sich mit Rezeptorinteraktionen im Renin-Angiotensin-System beschäftigen, bevorzugen Messungen der Aktivierungen von G-Proteinen oder *Second Messengern*.<sup>110-112</sup> Die intrazellulären Signalkaskaden für den Rezeptor Mas sowie für den AT2-Rezeptor sind je-

doch komplex und nicht vollständig entschlüsselt.<sup>113,114</sup> Hinzu kommt, dass für den AT2-Rezeptor mehrfach belegt wurde, dass dieser zwar in die Gruppe der Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen gehört, jedoch kein klassischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor ist.<sup>37</sup> Für die vorliegende Arbeit wurde aus diesen Gründen die Veränderung der mRNA-Expression eines Zielgenes nach Rezeptorstimulation untersucht.

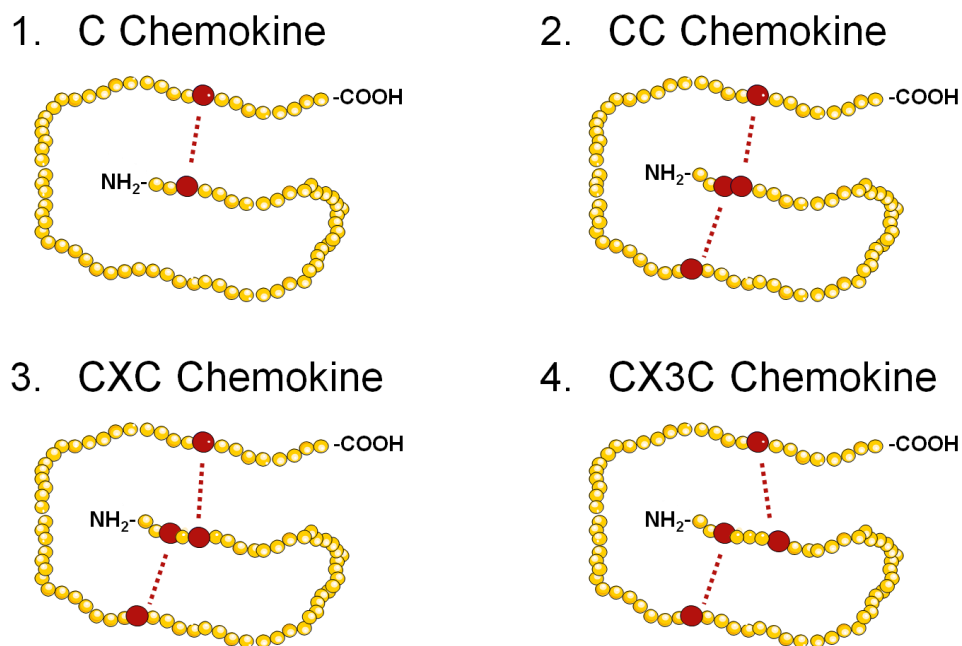
### 5.2.2.2 CX3CR1 als Zielgen

Um Untersuchungen auf mRNA-Ebene durchführen zu können, war es notwendig, Gene zu identifizieren, die durch Rezeptorstimulation vermehrt exprimiert werden. Hierfür wurden, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, verschiedene vorausgewählte Gene untersucht. CX3CR1 zeigte von allen untersuchten Genen die stärkste Regulation. Folglich wurde CX3CR1 als das am besten geeignete Zielgen ausgewählt.

CX3CR1 gehört zur Gruppe der Chemokinrezeptoren. Ganz allgemein sind dies Rezeptoren, mit denen Immunzellen Chemokine, die bei Entzündungen freigesetzt werden, wahrnehmen. Die Immunzellen können sich dann entlang eines Chemokin-Gradienten zum Ort der Entzündung bewegen.<sup>115,116</sup> Darüber hinaus sind viele der über 20 bisher bekannten Chemokinrezeptoren für die Pathogenese verschiedener Erkrankungen von Bedeutung.<sup>115,117</sup> Beispielsweise zählen Chemokinrezeptoren zu den Korezeptoren für das Humane Immundefizienz-Virus (HIV).<sup>118</sup> So gelten Menschen mit einer bestimmten Mutationen in dem Chemokinrezeptor CCR5 als weitgehend resistent gegenüber bestimmten HIV-Stämmen.<sup>119,120</sup> Im Februar 2007 wurde an der Charité Berlin erstmals ein Patient von HIV geheilt. Diese Heilung basierte auf einer Transplantation von heterologen Stammzellen mit einer Mutation im Chemokinrezeptor CCR5.<sup>121</sup>

Chemokine sind kleine Proteine, die nach der Anzahl der Disulfidbrücken nahe ihres N-Terminus klassifiziert und benannt werden (siehe Abbildung 5.2). Jedes C im Namen des Chemokins steht dabei für ein Cysteinpaar, welches über eine Disulfidbrücke verbunden ist. Bei mehr als einer Disulfidbrücke gibt jeweils ein X die Anzahl der Aminosäuren zwischen den Disulfidbrücken an. CX3CR1 ist der Rezeptor für das Chemokin CX3CL1. Dieses Chemokin besitzt zwei Disulfidbrücken, welche durch drei Aminosäu-

ren voneinander getrennt sind, was ursprünglich als C-X-X-X-C beschrieben wurde. C-X-X-X-C wurde im Verlauf als CX3C abgekürzt. Innerhalb dieser Nomenklatur erhalten die Chemokine ein L (für Ligand) und die Rezeptoren der Chemokine ein R. CX3CL1 bindet an den Rezeptor CX3CR1 und ist das zuerst beschriebene und bislang einzige bekannte Chemokin der CX3C-Familie. Es erhielt daher die Ziffer Eins im Namen.<sup>122</sup>



**Abbildung 5.2:** Vereinfachte schematische Darstellung verschiedener Chemokinfamilien nach Townson et al.<sup>122</sup> Über Disulfidbrücken verknüpfte Cysteine sind rot dargestellt. Die Nomenklatur der Chemokinfamilien richtet sich nach der Anzahl der Disulfidbrücken innerhalb der N-terminalen Domäne. Jedes C im Namen der Chemokinfamilie steht für ein Cysteinpaar, welches über eine Disulfidbrücke verbunden ist. Bei mehr als einer Disulfidbrücke gibt jeweils ein X die Anzahl der Aminosäuren zwischen den Cysteinen an. Der in dieser Arbeit untersuchte Rezeptor CX3CR1 bindet das Chemokin CX3CL1. Dieses Chemokin ist durch zwei Disulfidbrücken gekennzeichnet, welche durch drei Aminosäuren voneinander getrennt sind.

Im Hirn sezernieren verschiedene Zellen CX3CL1, welches auch als Fraktalkin bezeichnet wird. Fraktalkin agiert dabei sowohl als membrangebundenes Molekül als auch als lösliches Chemokin und bindet exklusiv an den CX3CR1-Rezeptor.<sup>122,123</sup> Dieser Fraktalkin-Rezeptor wird z. B. von Mikrogliazellen und Astrozyten exprimiert.<sup>124</sup> So führt

beispielsweise CX3CL1, welches von Neuronen während Entzündungsprozessen freigesetzt wird, durch Bindung an den CX3CR1-Rezeptor zur Migration von Mikroglia an den Ort der Inflammation.<sup>125</sup> Überdies hat CX3CR1 wichtige Funktionen bei der Apoptose, Zellproliferation und Neuroprotektion.<sup>117,126</sup> So vermittelt die Fraktalkin-CX3CR1-Achse in Mausmodellen des Schlaganfalls, der Amyotrophen Lateralsklerose, des Morbus Parkinson sowie der Multiplen Sklerose neuroprotektive Effekte.<sup>126-128</sup> CX3CR1 und Fraktalkin werden nach traumatischer Rückenmarkschädigung vermehrt exprimiert und scheinen bei der Begrenzung der Gewebeschädigung eine Rolle zu spielen.<sup>129</sup> Cho et al. konnten zeigen, dass eine zu geringe Expression von CX3CR1 zum Auftreten von Morbus Alzheimer beiträgt.<sup>130</sup>

Auch über das Renin-Angiotensin-System werden neuroprotektive Effekte vermittelt, wobei insbesondere dem AT2-Rezeptor hierbei eine wichtige Rolle zukommt. So führt eine indirekte Stimulation des AT2-Rezeptors durch AT1-Rezeptor-Antagonisten zu einem Rückgang der Demenzprogression bei Patienten mit Morbus Alzheimer.<sup>131,132</sup> Im Tiermodell führte die direkte Stimulation mit dem selektiven AT2R-Agonisten C21 zu einer signifikanten Verbesserung der Gedächtnisfunktion.<sup>133</sup> Jüngste Studien unserer Arbeitsgruppe legen nahe, dass C21 auch bei Multipler Sklerose und traumatischer Rückenmarkschädigung das Krankheitsgeschehen positiv beeinflusst.<sup>107,134</sup> Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass eine AT2R-Stimulation die Expression des Rezeptors CX3CR1 triggert. Die beschriebenen neuroprotektiven Effekte der AT2-Rezeptor-Stimulation könnten somit, zumindest teilweise, durch eine vermehrte CX3CR1-Synthese begründet sein. Mit Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen könnte dieser Zusammenhang ein wichtiger Ansatz sein.

### **5.3 Wirkung und Rezeptorspezifität der verwendeten Substanzen**

#### **5.3.1 Wirkung der Rezeptoragonisten**

Sowohl eine Stimulation des AT2-Rezeptors als auch des Rezeptors Mas mit ihren jeweiligen Agonisten führten zu einer signifikant erhöhten CX3CR1-Expression. Die zuvor durchgeführten Genexpressionsanalysen hatten eine Erhöhung der CX3CR1-

Expression nach AT2-Rezeptor-Stimulation in Neuronen bereits belegt. Diese vorab gewonnenen Ergebnisse konnten durch mehrere voneinander unabhängige Experimente in Wildtyp-Astrozyten bestätigt werden (Kapitel 4.2.1). Sowohl Agonisten des AT2-Rezeptors als auch des Rezeptors Mas steigerten die Expression von CX3CR1. Der AT2-Rezeptor und der Rezeptor Mas vermitteln vielfach gleiche oder ähnliche Wirkungen.<sup>13</sup> Die Tatsache, dass der AT2-Rezeptor oder der Rezeptor Mas Einfluss auf die CX3CR1-Expression haben, war jedoch bislang nicht bekannt. Lediglich eine Studie von Apostolakis und Mitarbeitern deutet einen derartigen Zusammenhang an.<sup>135</sup> Hierbei führte Angiotensin II zu einer vermehrten CX3CR1-Expression in THP-1-Zellen (Zellen einer humanen Monozyten-Leukämie-Zelllinie). Der AT1-Rezeptor-Antagonist Losartan konnte diese Wirkung nicht aufheben, was nahe legt, dass die Wirkung von Angiotensin II durch Bindung am AT2-Rezeptor vermittelt wird. Dies würde die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse bezüglich der AT2-Rezeptor-vermittelten Wirkung auf CX3CR1 unterstützen. Es wäre allerdings auch denkbar, dass Angiotensin II über das Enzym ACE2 zu Angiotensin-(1-7) gespalten wird und Angiotensin-(1-7) am Rezeptor Mas wirkt. Das würde eher die vorliegenden Ergebnisse der vermehrten CX3CR1-Expression nach Stimulation des Rezeptors Mas mit Angiotensin-(1-7) bekräftigen.

### **5.3.2 Wirkung der Rezeptorantagonisten**

Die alleinige Inkubation der Astrozyten mit PD123319 und A-779 hatte keinen Effekt auf die CX3CR1-Genexpression. Dies legt nahe, dass beide Substanzen als kompetitive Antagonisten am jeweiligen Rezeptor wirken. Dabei binden die Antagonisten am aktiven Zentrum des Rezeptors ohne selbst einen Effekt auszulösen und verdrängen somit die Agonisten des Rezeptors. Diese Verdrängung der Agonisten durch PD123319 und A-779 konnte im Rahmen von Bindungsstudien belegt werden.<sup>63,21</sup>

### **5.3.3 Rezeptorspezifität des MasR-Agonisten Ang-(1-7)**

Die Effekte von Angiotensin-(1-7) konnten sowohl durch den MasR-spezifischen Antagonisten A-779 als auch durch Knockout des Rezeptors Mas aufgehoben werden. Dies belegt die spezifische Bindung von Ang-(1-7) am Rezeptor Mas. Eine Wirkung von Angiotensin-(1-7) am AT2-Rezeptor oder AT1-Rezeptor scheint daher unwahrschein-

lich. Die Beobachtung, dass Ang-(1-7)-Wirkungen spezifisch über den Rezeptor Mas vermittelt sind, wird durch eine Anzahl an Studien unterstützt.<sup>21,23</sup> Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit war die Frage, ob Ang-(1-7) nicht nur den Rezeptor Mas, sondern auch den AT2-Rezeptor stimulieren kann. Diese Möglichkeit war wiederholt Anlass wissenschaftlicher Kontroversen. Hintergrund dieser Streitfrage war das „PD-Phänomen“, welches in Kapitel 2.4 näher erläutert wurde, d.h. die Tatsache, dass Angiotensin-(1-7)-vermittelte Effekte durch PD123319 gehemmt werden können. Einige Autoren vermuteten daher, dass Angiotensin-(1-7) seine Wirkungen über den AT2-Rezeptor entfalten könnte.<sup>66,67,73,77,81</sup> Die hier durchgeführten Versuche widerlegen diese Möglichkeit zumindest für die Effekte auf die CX3CR1-Expression in Astrozyten. Dies ist im Einklang mit durchgeführten Bindungsstudien, die verifizieren konnten, dass Angiotensin-(1-7) nicht oder nur mit geringer Affinität am AT2R bindet.<sup>21,30,31,63,72</sup>

### 5.3.4 Rezeptorspezifität des AT2R-Agonisten *Compound 21*

Auch für *Compound 21* konnte eine spezifische Wirkung über den AT2-Rezeptor gezeigt werden. Zum einen konnten die durch *Compound 21* (*C21*) vermittelten Wirkungen durch den AT2-Rezeptor-Antagonisten PD123319 aufgehoben werden. Zum anderen konnte *C21* in AT2-Rezeptor-defizienten Zellen keine Effekte auslösen. *C21* scheint daher selektiv am AT2-Rezeptor zu binden. Diese Ergebnisse werden durch eine Vielzahl von Studien gestützt.<sup>63,64,136</sup>

## 5.4 Experimente zur Interaktion von MasR und AT2R

### 5.4.1 Kostimulation von MasR und AT2R

Sowohl der Rezeptor Mas als auch der AT2-Rezeptor führen bei Einzelstimulation zu einer Erhöhung der CX3CR1-Expression. Wenn zwei Rezeptoren die gleiche Wirkung haben, können sich bei zeitgleicher Stimulation beider Rezeptoren die Effekte addieren, potenzieren oder dem Wert der Einzelstimulation entsprechen. Es zeigte sich kein additiver Synergismus zwischen dem AT2-Rezeptor und dem Rezeptor Mas. Im Gegenteil entsprachen die Werte unter Kostimulation beider Rezeptoren etwa denen der Einzelstimulation. Nach dem Wissen der Autorin sowie aller an diesem Projekt Beteiligten, ist

die vorliegende Arbeit die erste Studie, welche die Effekte unter zeitgleicher Stimulation beider Rezeptoren untersucht. Jedoch existieren mehrere Publikationen, welche die Auswirkungen einer zeitgleichen Applikation von Angiotensin II und Angiotensin-(1-7) untersuchen. Hierbei verweisen die jeweiligen Autoren jedoch entweder darauf, dass es sich bei den Angiotensin-II-Wirkungen um AT1R-Effekte handelt oder es kann nicht festgestellt werden, über welchen Rezeptor die Wirkungen vermittelt werden.<sup>61,137-139</sup>

### 5.4.2 MasR-Funktion bei funktioneller Inaktivierung des AT2R

Wie in Kapitel 4.3.2.1 gezeigt, führte eine Antagonisierung mit PD123319 zu einer signifikanten Hemmung der Angiotensin-(1-7)-vermittelten Effekte. Dieses „PD-Phänomen“ wurde bereits von zahlreichen Autoren verschiedenster Arbeitsgruppen beschrieben.<sup>30,31,66-71,73,75-84</sup> Es war Ausgangspunkt und Anlass für die vorliegende Arbeit (siehe auch Kapitel 2.4). Für einige Autoren waren diese Beobachtungen Grund erstmals über funktionelle Interaktionen und Dimerisierungen von AT2R und MasR zu spekulieren.<sup>76,82,83,92</sup> Es soll allerdings auch erwähnt werden, dass AT2-Rezeptor-Antagonisten unter bestimmten Versuchsbedingungen die Angiotensin-(1-7)-vermittelten Effekte nicht inhibieren.<sup>85-87</sup>

Überdies führt ein funktioneller Knockout des AT2-Rezeptors zur Inhibition der Wirkung von Angiotensin-(1-7). Die Stimulation des Rezeptors Mas führt somit nur in Wildtyp-Astrozyten, nicht aber in AT2R-Knockout-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der CX3CR1-Expression. Dies und die Tatsache, dass PD123319 zu einer signifikanten Hemmung der Angiotensin-(1-7)-vermittelten Wirkungen führt, deutet stark auf eine Interaktion zwischen dem Rezeptor Mas und dem AT2-Rezeptor hin. Publierte experimentelle In-vitro-Versuche zur Angiotensin-(1-7)-Wirkung in AT2R-KO-Zellen existieren nicht. Lediglich eine 2012 von Gembardt und Mitarbeitern veröffentlichte Studie untersuchte die Auswirkungen einer AT2-Rezeptor-Defizienz auf die Angiotensin-(1-7)-Funktion *in vivo*. Hierbei erwiesen sich die durch Angiotensin-(1-7)-vermittelten Blutdruckwirkungen als stabil und waren auch in AT2R-KO-Tieren auslösbar.<sup>140</sup> Dabei stehen die Ergebnisse von Gembardt et al. nicht im Widerspruch zu den in Kapitel 4.3.2.2 präsentierten Daten. Verschiedene Faktoren sind in der Lage die Interaktionen zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu beeinflussen. So konnten Abd Alla et al.



belegen, dass die Glucosekonzentration sowie das Vorkommen von Chaperonen maßgebliche Auswirkungen auf die Proteinreifung und damit die Interaktionen zwischen Rezeptoren hat.<sup>93</sup> Zudem konnten Waldhoer und Mitarbeiter nachweisen, dass das Auftreten von Dimeren von Opioidrezeptoren abhängig vom jeweiligen Gewebetyp ist.<sup>141</sup> Es wäre daher gut vorstellbar, dass auch die funktionelle Interaktion zwischen MasR und AT2R gewebespezifisch auftritt. Das Auftreten des „PD-Phänomens“ in einigen Publikationen sowie die Widerlegung eben jenes Phänomens in anderen Studien scheint diese Möglichkeit zu stärken.

### 5.4.3 AT2R-Funktion bei funktioneller Inaktivierung des MasR

A-779, ein spezifischer Antagonist am Rezeptor Mas, führte zu einer vollständigen Inhibition der C21-vermittelten Effekte. Dies wurde bislang in keiner Studie gezeigt. Es existieren jedoch Studien, welche belegen, dass Angiotensin-II-vermittelte Effekte durch A-779 gehemmt werden können. Diese Publikationen sind im Einklang mit den hier dargestellten Ergebnissen, verwenden jedoch statt dem selektiven AT2R-Agonisten C21 das natürlich vorkommende Angiotensin II. Dabei bleibt jedoch unklar, ob die Angiotensin-II-vermittelten Effekte durch den AT1- oder AT2-Rezeptor vermittelt werden.<sup>142-144</sup>

C21 führt durch Bindung am AT2-Rezeptor zur vermehrten Expression von CX3CR1. Sowohl die Mas-Rezeptor-Defizienz der Astrozyten als auch die Antagonisierung des Rezeptors Mas mittels A-779 konnten diese Wirkung inhibieren. Eine funktionelle Interaktion zwischen beiden Rezeptoren ist unter diesem Aspekt wahrscheinlich. Zum Zeitpunkt des Entstehens und der Auswertung dieser Arbeit lag nur eine Studie zur AT2-Rezeptor-Funktion unter MasR-Defizienz vor. Lemos et al. hatten die durch AT2R-Stimulation hervorgerufene Vasodilatation von Aortenringen untersucht. Diese war sowohl bei Wildtyp- als auch bei MasR-KO-Mäusen nachweisbar.<sup>145</sup> Es scheint somit, dass es auch Konstellationen gibt, unter denen eine MasR-Inhibition nicht zu einer verminderten AT2R-Funktion führt. Die Nährstoffkonzentrationen in der Umgebung der Zelle oder Gewebsspezifitäten von Rezeptorinteraktionen können hierbei von essentieller Bedeutung sein.<sup>93,141</sup>

### 5.4.4 TNF $\alpha$ als Positivkontrolle

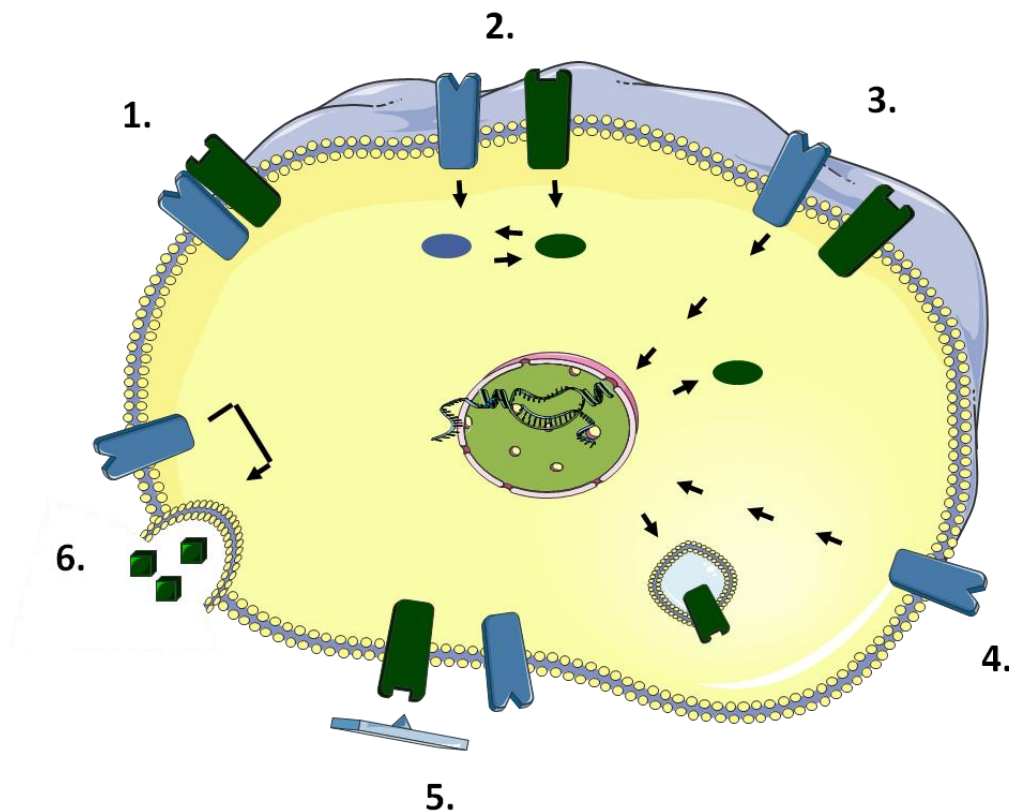
Im Gegensatz zu den Versuchen in Wildtyp-Astrozyten zeigte die Stimulation der Knockout-Zellen mit Agonisten keinen Effekt auf die CX3CR1-Expression. So erzielte beispielsweise in MasR-Knockout-Zellen weder der Agonist des Mas-Rezeptors noch des AT2-Rezeptors eine Wirkung. Zur Validierung der Methode und Versuchssensitivität wurden die Versuche unter Mitführung einer Positivkontrolle wiederholt. Hierbei konnten die Ergebnisse bestätigt werden und eine signifikante Regulation der CX3CR1-Expression unter TNF $\alpha$  gezeigt werden. Der nachgewiesene hochsignifikante Unterschied zwischen der Stimulation in Wildtyp- und Knockout-Astrozyten ist daher durch funktionelle Interaktion der beiden Rezeptoren erklärbar. Die CX3CR1-Expression in kultivierten Astrozyten nach TNF $\alpha$ -Stimulation ist Gegenstand mehrerer Publikationen.<sup>124,146,147</sup> Die Experimente der Arbeitsgruppe um Luo wurden, ähnlich den Experimenten dieser Arbeit, in Astrozyten der Maus durchgeführt. Sowohl Luo et al. als auch die Daten dieser Arbeit belegen, dass eine TNF $\alpha$ -Stimulation von kultivierten Mausastrozyten zu einer Suppression der CX3CR1-Expression führt.<sup>147</sup>

### 5.5 Mögliche Ursachen von funktioneller Interaktion und fehlendem additiven Synergismus

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Hemmung eines Rezeptors auch zur Inhibition des anderen Rezeptors führt, was als Transinhibition bezeichnet wird.<sup>148</sup> Eine zeitgleiche Stimulation von MasR und AT2R führt zu keinem Effekt, der über eine Einzelstimulation hinausgehen würde. Dies deutet darauf hin, dass sich beide Rezeptoren in ihrer Funktion maßgeblich beeinflussen. Diese Interaktion kann auf verschiedenen Ebenen stattfinden.<sup>149,150</sup> Folgende Rezeptorinteraktionen (siehe auch Abbildung 5.3) sind denkbar:

1. Durch Bildung von Dimeren oder Oligomeren könnten die Rezeptoren direkt miteinander interagieren. Durch den engen räumlichen Kontakt könnte die Bindung eines Antagonisten zu einer Konformationsänderung beider Rezeptoren führen und damit auch die Affinität zum Agonisten des anderen Rezeptors beeinflussen.

2. Ferner könnten intrazelluläre Signaltransduktionsproteine miteinander interagieren. Die Signaltransduktionswege des AT<sub>2</sub>-Rezeptors sowie des Rezeptors Mas sind Gegenstand intensiver Forschung und bislang in ihrem Ausmaß nur unvollständig aufgeklärt.<sup>113,114</sup> Daher kann über mögliche intrazelluläre Proteininteraktionen nur gemutmaßt werden. Eine mögliche Verknüpfung beider Signalkaskaden ist die Tyrosinkinase *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1* (SHP-1). Es wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass eine Stimulation des AT<sub>2</sub>R SHP-1 aktiviert.<sup>114</sup> Gava et al. konnten 2009 belegen, dass auch die Bindung von Ang-(1-7) an den MasR SHP-1 stimuliert.<sup>151</sup> Dies wurde 2014 durch Tao und Mitarbeiter bestätigt.<sup>152</sup> Neben SHP-1 könnten ERK1/2 oder NF-κB Verknüpfungen beider Signalkaskaden darstellen.<sup>61,153,154</sup> Da beide Rezeptoren jedoch multiple Signalkaskaden initiieren können, bedarf es weiterer Abklärung um die Bedeutung dieser Signaltransduktionsproteine für die Interaktion von MasR und AT<sub>2</sub>R zu bestimmen.
3. Ein funktionsfähiger Rezeptor könnte überdies für die Synthese von Signaltransduktionsproteinen des anderen Rezeptors notwendig sein.
4. Die Existenz eines aktiven Rezeptors könnte die Expression des anderen Rezeptors induzieren.
5. Ein Teil der Transinhibitionswirkung könnte durch unspezifische Bindungen der Antagonisten am fremden Rezeptor erklärbar sein. Mit Hinblick auf die Ergebnisse aus den Knockout-Astrozyten sowie bereits publizierter Bindungsstudien, welche eine spezifische Bindung der Antagonisten am jeweiligen Rezeptor belegen,<sup>21,63</sup> scheint dies jedoch unwahrscheinlich.
6. Die Stimulation eines Rezeptors könnte zur Freisetzung des Agonisten des anderen Rezeptors führen. Somit wäre eine Rezeptorfunktion direkt an die andere gekoppelt.



**Abbildung 5.3:** Vereinfachte schematische Darstellung möglicher Ursachen für Rezeptortransinhibition und fehlenden additiven Synergismus ähnlich Lyngsø et al.<sup>149</sup> 1. Dimerisierung/Oligomerisierung, 2. Interaktion von Signaltransduktionsproteinen, 3. veränderte Expression von Signaltransduktionsproteinen, 4. Änderung der Rezeptorexpression, 5. unspezifische Bindung der Antagonisten, 6. Sekretion von Rezeptorliganden.

Obwohl die vorliegende Arbeit eine funktionelle Interaktion beider Rezeptoren belegt, kann sie nicht deren Art erklären. Die ersten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, welche bereits auf eine Transinhibition hindeuteten, waren jedoch Ausgangspunkt für weitere Forschungsprojekte unserer Arbeitsgruppe. So konnte mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) die Dimerisierung von AT<sub>2</sub>R und MasR bewiesen werden.<sup>155</sup> Eine Bildung von Heterodimeren kann die Funktion von Rezeptoren maßgeblich beeinflussen. So kann die Rezeptorwirkung innerhalb des Dimers gehemmt,<sup>156,157</sup> verstärkt<sup>158,159</sup> oder unverändert sein. Im Fall von GABA<sub>B1</sub> und GABA<sub>B2</sub>-Rezeptoren sowie bestimmten Chemokinrezeptoren ist die Heterodimerisierung essentiell für die Rezeptorfunktion und -expression.<sup>160,161</sup> Die Zusammenschau der FRET-Experimente sowie der vorliegenden Arbeit deutet das Vorliegen eines Rezeptordimers an, bei welchem die Rezeptorfunktion vom aktiven Dimerisierungspartner abhängig ist.

## 5.6 Medizinische und biologische Bedeutung von funktioneller Interaktion und Dimerisierung von MasR und AT2R

Die Erforschung von Interaktionen zwischen Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren ist eine Domäne der Grundlagenforschung. Sie dient daher in erster Linie dazu, molekulare Vorgänge besser zu verstehen. Dennoch erlangte die Identifikation funktioneller Rezeptorinteraktionen in den vergangenen Jahren auch klinische Bedeutung und konnte zur Aufklärung der Pathogenese verschiedener Erkrankungen beitragen. So konnten AbdAlla und Mitarbeiter zeigen, dass die Bildung von Rezeptordimeren bei der Entstehung von Präeklampsie und Morbus Alzheimer eine Rolle spielen kann.<sup>14,102,158,159</sup> Auch bei kardiovaskulären Erkrankungen wie Hypertonie und Arteriosklerose sind Dimere maßgeblich beteiligt.<sup>162,163</sup> Beispielsweise tragen Heterodimere von AT1R und B2-Bradykinin-Rezeptor zur Entstehung von bestimmten Formen des arteriellen Hypertonus bei.<sup>159,162</sup> Überdies liefert die Erforschung von Rezeptorinteraktionen bedeutende Beiträge für die medikamentöse Therapieplanung und Medikamentenentwicklung. Barki-Harrington und Mitarbeiter konnten 2003 zeigen, dass Transinhibitionsphänomene zwischen dem  $\beta$ -Adrenorezeptor und dem Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 existieren.<sup>112</sup> Diese Transinhibitionsphänomene waren auf eine Dimerisierung zurückzuführen. Damit konnte gezeigt werden, dass Kombinationstherapien aus Betablockern und AT1-Rezeptor-Antagonisten nicht sinnvoll waren. Dies war auch in großen Patientenstudien bestätigt worden.<sup>112,164</sup> Dimere von Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren gelten weiterhin als vielversprechender Angriffspunkt neuer Medikamente. Einigen Forschergruppen ist es bereits gelungen, Medikamente zu entwickeln, welche an den Dimeren, nicht aber an den Rezeptormonomeren binden.<sup>141,165</sup> Durch die höhere Bindungsspezifität scheinen diese Medikamente weniger Nebenwirkungen als die bisherigen Präparate zu haben. So bindet das Substrat *N-naphthoyl-beta-naltrexamine (NNTI)* selektiv an Heterodimere aus  $\mu$ - und  $\kappa$ -Opioidrezeptor, wirkt analgetisch und entfaltet dabei weniger unerwünschte Effekte als Vergleichsstoffe.<sup>165</sup> Es wird geschätzt, dass 25 % aller verschriebenen Medikamente an Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren binden.<sup>166</sup> G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bzw. Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren liegen in der Regel als Dimer oder Oligomer vor.<sup>167,168</sup> Die Erforschung von Rezeptorinteraktionen wie

Dimerisierungen scheint folglich große Möglichkeiten für die Entwicklung neuer Pharmaka zu bieten.

Die physiologische Bedeutung von Dimerisierung und Rezeptorinteraktionen scheint in einer Erhöhung der Vielfalt von Reaktionsmöglichkeiten der Zelle zu liegen. Rezeptorinteraktionen können dabei für die Feinregulierung von Rezeptorfunktionen dienen.<sup>169</sup>

### **5.7 Funktionelle Interaktionen und Dimerisierungen im Renin-Angiotensin-System**

Interaktionen zwischen Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren, die auf Dimerisierungen zurückzuführen sind, wurden bereits mehrfach beschrieben. Dies gilt auch für die Rezeptoren des Renin-Angiotensin-Systems. So konnten Homodimere des AT1R<sup>163,170</sup> und AT2R<sup>14,171</sup> nachgewiesen werden. Ferner wurden die Existenz von Heterodimeren zwischen AT1R und AT2R<sup>156</sup> sowie zwischen AT1R und MasR<sup>157</sup> belegt. Homo- und Heterodimere von Rezeptoren des RAS sind an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, wie der Alzheimer-Demenz, der Präeklampsie, der arteriellen Hypertonie und der Arteriosklerose beteiligt.<sup>14,102,158,159,162,163</sup> Über Rezeptorinteraktionen durch Dimerisierung zwischen AT2R und MasR liegt bislang keine Studie vor. Diese Arbeit könnte daher eine wichtige Lücke schließen und einen bedeutenden Beitrag zum Verständnis der vielfältigen Rezeptorinteraktionen im Renin-Angiotensin-System leisten.

### **5.8 Limitationen der vorliegenden Arbeit und Ausblick**

Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise auf eine funktionelle Interaktion zwischen AT2R und MasR. Jedoch ist zu beachten, dass dabei nur die Expression eines Gens in einem Modellorganismus (kultivierte murine Astrozyten) untersucht wurde. Ob die Ergebnisse auch mit anderen Zellkulturen, Spezies, Versuchsprotokollen oder *in vivo* replizierbar sind, bleibt ungeklärt. Weitere Untersuchungen sollten daher prüfen, ob es sich bei der Rezeptorinteraktion zwischen AT2R und MasR um ein allgemeingültiges Prinzip handelt. Zur Bestätigung der Rezeptordimerisierung und ihrer Auswirkungen könnten Tech-

niken wie Koimmunopräzipitation oder Ligandenbindungsstudien zur Anwendung kommen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Tigerstedt R, Bergman P. Niere und Kreislauf. Scand Arch Physiol 1898;8:223-71.
2. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. Biochemical and biophysical research communications 1989;165:196-203.
3. Speth RC, Kim KH. Discrimination of two angiotensin II receptor subtypes with a selective agonist analogue of angiotensin II, p-aminophenylalanine<sup>6</sup> angiotensin II. Biochemical and biophysical research communications 1990;169:997-1006.
4. de Gasparo M, Whitebread S, Mele M, et al. Biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes in the rat. Journal of cardiovascular pharmacology 1990;16 Suppl 4:S31-5.
5. Abadir PM, Walston JD, Carey RM. Subcellular characteristics of functional intracellular renin-angiotensin systems. Peptides 2012;38:437-45.
6. Harrison-Bernard LM. The renal renin-angiotensin system. Advances in physiology education 2009;33:270-4.
7. Seva Pessoa B, van der Lubbe N, Verdonk K, Roks AJ, Hoorn EJ, Danser AH. Key developments in renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. Nature reviews Nephrology 2013;9:26-36.
8. 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.
9. Foulquier S, Steckelings UM, Unger T. Perspective: A tale of two receptors. Nature 2013;493:S9.
10. Steckelings UM, Paulis L, Namsolleck P, Unger T. AT<sub>2</sub> receptor agonists: hypertension and beyond. Current opinion in nephrology and hypertension 2012;21:142-6.
11. Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. The Journal of endocrinology 2013;216:R1-R17.



12. Sumners C, Horiuchi M, Widdop RE, McCarthy C, Unger T, Steckelings UM. Protective arms of the renin-angiotensin-system in neurological disease. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 2013;40:580-8.
13. Bader M, Santos RA, Unger T, Steckelings UM. New therapeutic pathways in the RAS. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2012;13:505-8.
14. AbdAlla S, Lothar H, el Missiry A, et al. Angiotensin II AT2 receptor oligomers mediate G-protein dysfunction in an animal model of Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry* 2009;284:6554-65.
15. Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 1986;45:711-9.
16. Zohn IE, Symons M, Chrzanowska-Wodnicka M, Westwick JK, Der CJ. Mas oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein Rac. *Molecular and cellular biology* 1998;18:1225-35.
17. Cebra-Thomas JA, Tsai JY, Pilder SH, Copeland NG, Jenkins NA, Silver LM. Localization of the Mas proto-oncogene to a densely marked region of mouse chromosome 17 associated with genomic imprinting. *Genomics* 1992;13:444-6.
18. Metzger R, Bader M, Ludwig T, Berberich C, Bunnemann B, Ganten D. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS letters* 1995;357:27-32.
19. Rabin M, Birnbaum D, Young D, Birchmeier C, Wigler M, Ruddle FH. Human *ros1* and *mas1* oncogenes located in regions of chromosome 6 associated with tumor-specific rearrangements. *Oncogene research* 1987;1:169-78.
20. van 't Veer LJ, van den Berg-Bakker LA, Hermens RP, Deprez RL, Schrier PI. High frequency of mas oncogene activation detected in the NIH3T3 tumorigenicity assay. *Oncogene research* 1988;3:247-54.
21. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:8258-63.
22. Ferreira AJ, Jacoby BA, Araujo CA, et al. The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *American journal of physiology* 2007;292:H1113-9.
23. Santos RA, Castro CH, Gava E, et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* 2006;47:996-1002.

24. Souza AP, Sobrinho DB, Almeida JF, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade restores angiotensin-(1-7)-induced coronary vasodilation in hypertrophic rat hearts. *Clin Sci (Lond)* 2013;125:449-59.
25. Benter IF, Yousif MH, Anim JT, Cojocel C, Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *American journal of physiology* 2006;290:H684-91.
26. Sasaki S, Higashi Y, Nakagawa K, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T. Effects of angiotensin-(1-7) on forearm circulation in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Hypertension* 2001;38:90-4.
27. Singh Y, Singh K, Sharma PL. Effect of combination of renin inhibitor and Mas-receptor agonist in DOCA-salt-induced hypertension in rats. *Molecular and cellular biochemistry* 2013;373:189-94.
28. Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes* 2008;57:340-7.
29. Benter IF, Yousif MH, Dhaunsi GS, Kaur J, Chappell MC, Diz DI. Angiotensin-(1-7) prevents activation of NADPH oxidase and renal vascular dysfunction in diabetic hypertensive rats. *American journal of nephrology* 2008;28:25-33.
30. Wiemer G, Dobrucki LW, Louka FR, Malinski T, Heitsch H. AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension* 2002;40:847-52.
31. Pinheiro SV, Simoes e Silva AC, Sampaio WO, et al. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension* 2004;44:490-6.
32. Ambuhl P, Felix D, Khosla MC. [7-D-ALA]-angiotensin-(1-7): selective antagonism of angiotensin-(1-7) in the rat paraventricular nucleus. *Brain research bulletin* 1994;35:289-91.
33. Santos RA, Haibara AS, Campagnole-Santos MJ, et al. Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), D-pro7-angiotensin-(1-7). *Hypertension* 2003;41:737-43.
34. Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, et al. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *The Journal of biological chemistry* 1993;268:24543-6.

35. Nakajima M, Mukoyama M, Pratt RE, Horiuchi M, Dzau VJ. Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 1993;197:393-9.
36. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews* 2000;52:415-72.
37. Funke-Kaiser H, Reinemund J, Steckelings UM, Unger T. Adapter proteins and promoter regulation of the angiotensin AT2 receptor--implications for cardiac pathophysiology. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2010;11:7-17.
38. Hein L, Dzau VJ, Barsh GS. Linkage mapping of the angiotensin AT2 receptor gene (Agtr2) to the mouse X chromosome. *Genomics* 1995;30:369-71.
39. Tissir F, Riviere M, Guo DF, et al. Localization of the genes encoding the three rat angiotensin II receptors, Agtr1a, Agtr1b, Agtr2, and the human AGTR2 receptor respectively to rat chromosomes 17q12, 2q24 and Xq34, and the human Xq22. *Cytogenetics and cell genetics* 1995;71:77-80.
40. Koike G, Horiuchi M, Yamada T, Szpirer C, Jacob HJ, Dzau VJ. Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochemical and biophysical research communications* 1994;203:1842-50.
41. Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE. Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *The Journal of clinical investigation* 1991;88:921-33.
42. Shanmugam S, Lenkei ZG, Gasc JM, Corvol PL, Llorens-Cortes CM. Ontogeny of angiotensin II type 2 (AT2) receptor mRNA in the rat. *Kidney international* 1995;47:1095-100.
43. Viswanathan M, Tsutsumi K, Correa FM, Saavedra JM. Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochemical and biophysical research communications* 1991;179:1361-7.
44. Gao J, Chao J, Parbhu KJ, et al. Ontogeny of angiotensin type 2 and type 1 receptor expression in mice. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2012;13:341-52.
45. Yu L, Zheng M, Wang W, Rozanski GJ, Zucker IH, Gao L. Developmental changes in AT1 and AT2 receptor-protein expression in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2010;11:214-21.

46. Zhu YZ, Zhu YC, Li J, et al. Effects of losartan on haemodynamic parameters and angiotensin receptor mRNA levels in rat heart after myocardial infarction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2000;1:257-62.
47. Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Inada M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation* 1995;95:46-54.
48. Li J, Culman J, Hortnagl H, et al. Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J* 2005;19:617-9.
49. He M, Zhang L, Shao Y, et al. Angiotensin II type 2 receptor mediated angiotensin II and high glucose induced decrease in renal prorenin/renin receptor expression. *Molecular and cellular endocrinology* 2010;315:188-94.
50. Vazquez E, Coronel I, Bautista R, et al. Angiotensin II-dependent induction of AT(2) receptor expression after renal ablation. *American journal of physiology Renal physiology* 2005;288:F207-13.
51. Steckelings UM, Kaschina E, Unger T. The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides* 2005;26:1401-9.
52. Kaschina E, Grzesiak A, Li J, et al. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation* 2008;118:2523-32.
53. Yang Z, Bove CM, French BA, et al. Angiotensin II type 2 receptor overexpression preserves left ventricular function after myocardial infarction. *Circulation* 2002;106:106-11.
54. Bove CM, Gilson WD, Scott CD, et al. The angiotensin II type 2 receptor and improved adjacent region function post-MI. *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 2005;7:459-64.
55. Iwai M, Chen R, Li Z, et al. Deletion of angiotensin II type 2 receptor exaggerated atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 2005;112:1636-43.
56. Paulis L, Becker ST, Lucht K, et al. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation in Nomega-nitro-L-arginine-methyl ester-induced hypertension: the effect on pulse wave velocity and aortic remodeling. *Hypertension* 2012;59:485-92.
57. Rehman A, Leibowitz A, Yamamoto N, Rautureau Y, Paradis P, Schiffrin EL. Angiotensin type 2 receptor agonist compound 21 reduces vascular injury and myocardial fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2012;59:291-9.

58. Altarche-Xifro W, Curato C, Kaschina E, et al. Cardiac c-kit+AT2+ cell population is increased in response to ischemic injury and supports cardiomyocyte performance. *Stem cells* 2009;27:2488-97.
59. Gelosa P, Pignieri A, Fandriks L, et al. Stimulation of AT2 receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: focus on renal damage. *Journal of hypertension* 2009;27:2444-51.
60. Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. Angiotensin AT(2) receptor stimulation inhibits early renal inflammation in renovascular hypertension. *Hypertension* 2011;57:308-13.
61. Rompe F, Artuc M, Hallberg A, et al. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension* 2010;55:924-31.
62. 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.
63. 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. *Clin Sci (Lond)* 2011;121:297-303.
64. Wan Y, Wallinder C, Plouffe B, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT2 receptor agonist. *Journal of medicinal chemistry* 2004;47:5995-6008.
65. Blankley CJ, Hodges JC, Klutchko SR, et al. Synthesis and structure-activity relationships of a novel series of non-peptide angiotensin II receptor binding inhibitors specific for the AT2 subtype. *Journal of medicinal chemistry* 1991;34:3248-60.
66. Gironacci MM, Adler-Graschinsky E, Pena C, Enero MA. Effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on the release of [3H]norepinephrine from rat atria. *Hypertension* 1994;24:457-60.
67. Muthalif MM, Benter IF, Uddin MR, Harper JL, Malik KU. Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1998;284:388-98.
68. Jaiswal N, Diz DI, Chappell MC, Khosla MC, Ferrario CM. Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides. Characterization of receptors. *Hypertension* 1992;19:II49-55.
69. Jaiswal N, Tallant EA, Jaiswal RK, Diz DI, Ferrario CM. Differential regulation of prostaglandin synthesis by angiotensin peptides in porcine aortic smooth muscle cells:

subtypes of angiotensin receptors involved. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1993;265:664-73.

70. Gorelik G, Carbini LA, Scicli AG. Angiotensin 1-7 induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1998;286:403-10.

71. Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G. Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension* 2001;37:72-6.

72. Rowe BP, Saylor DL, Speth RC, Absher DR. Angiotensin-(1-7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain. *Regulatory peptides* 1995;56:139-46.

73. De Souza AM, Lopes AG, Pizzino CP, et al. Angiotensin II and angiotensin-(1-7) inhibit the inner cortex Na<sup>+</sup>-ATPase activity through AT<sub>2</sub> receptor. *Regulatory peptides* 2004;120:167-75.

74. Bosnyak S, Widdop RE, Denton KM, Jones ES. Differential mechanisms of ang (1-7)-mediated vasodepressor effect in adult and aged candesartan-treated rats. *International journal of hypertension* 2012;2012:192567.

75. Roks AJ, Nijholt J, van Buiten A, van Gilst WH, de Zeeuw D, Henning RH. Low sodium diet inhibits the local counter-regulator effect of angiotensin-(1-7) on angiotensin II. *Journal of hypertension* 2004;22:2355-61.

76. Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors in the mouse heart. *Hypertension* 2005;46:937-42.

77. Walters PE, Gaspari TA, Widdop RE. Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. *Hypertension* 2005;45:960-6.

78. Lara Lda S, Cavalcante F, Axelband F, De Souza AM, Lopes AG, Caruso-Neves C. Involvement of the Gi/o/cGMP/PKG pathway in the AT<sub>2</sub>-mediated inhibition of outer cortex proximal tubule Na<sup>+</sup>-ATPase by Ang-(1-7). *The Biochemical journal* 2006;395:183-90.

79. Costa MA, Lopez Verrilli MA, Gomez KA, et al. Angiotensin-(1-7) upregulates cardiac nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *American journal of physiology* 2010;299:H1205-11.

80. Durand MJ, Raffai G, Weinberg BD, Lombard JH. Angiotensin-(1-7) and low-dose angiotensin II infusion reverse salt-induced endothelial dysfunction via different mechanisms in rat middle cerebral arteries. *American journal of physiology* 2010;299:H1024-33.

81. Tesanovic S, Vinh A, Gaspari TA, Casley D, Widdop RE. Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010;30:1606-13.
82. Raffai G, Durand MJ, Lombard JH. Acute and chronic angiotensin-(1-7) restores vasodilation and reduces oxidative stress in mesenteric arteries of salt-fed rats. *American journal of physiology* 2011;301:H1341-52.
83. Mordwinkin NM, Meeks CJ, Jadhav SS, et al. Angiotensin-(1-7) administration reduces oxidative stress in diabetic bone marrow. *Endocrinology* 2012;153:2189-97.
84. Jiang T, Gao L, Zhu XC, et al. Angiotensin-(1-7) inhibits autophagy in the brain of spontaneously hypertensive rats. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 2013;71:61-8.
85. Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* 1996;27:523-8.
86. Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 1996;28:104-8.
87. Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *American journal of physiology* 2005;289:H1560-6.
88. Iwanami J, Mogi M, Tsukuda K, et al. Effect of angiotensin II type 2 receptor deletion in hematopoietic cells on brain ischemia-reperfusion injury. *Hypertension* 2011;58:404-9.
89. Walther T, Balschun D, Voigt JP, et al. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:11867-73.
90. Fogarty DJ, Sanchez-Gomez MV, Matute C. Multiple angiotensin receptor subtypes in normal and tumor astrocytes in vitro. *Glia* 2002;39:304-13.
91. Fogarty DJ, Matute C. Angiotensin receptor-like immunoreactivity in adult brain white matter astrocytes and oligodendrocytes. *Glia* 2001;35:131-46.
92. Ferreira AJ, Santos RA. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 2005;38:499-507.
93. Abd Alla J, Pohl A, Reeck K, Streichert T, Qwitterer U. Establishment of an in vivo model facilitates B2 receptor protein maturation and heterodimerization. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 2010;2:209-17.

94. Abd Alla J, Reeck K, Langer A, Streichert T, Quitterer U. Calreticulin enhances B2 bradykinin receptor maturation and heterodimerization. *Biochemical and biophysical research communications* 2009;387:186-90.
95. Wagstaff MJ, Shah M, McGrouther DA, Latchman DS. The heat shock proteins and plastic surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2007;60:974-82.
96. Jackson TR, Blair LA, Marshall J, Goedert M, Hanley MR. The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 1988;335:437-40.
97. Song K, Allen AM, Paxinos G, Mendelsohn FA. Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. *The Journal of comparative neurology* 1992;316:467-84.
98. Bunnemann B, Fuxe K, Metzger R, et al. Autoradiographic localization of mas proto-oncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization. *Neuroscience letters* 1990;114:147-53.
99. Young D, O'Neill K, Jessell T, Wigler M. Characterization of the rat mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988;85:5339-42.
100. 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.
101. Ganten D, Minnich JL, Granger P, et al. Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. *Science* 1971;173:64-5.
102. AbdAlla S, Lothar H, el Missiry A, et al. Dominant negative AT2 receptor oligomers induce G-protein arrest and symptoms of neurodegeneration. *The Journal of biological chemistry* 2009;284:6566-74.
103. Ge J, Barnes NM. Alterations in angiotensin AT1 and AT2 receptor subtype levels in brain regions from patients with neurodegenerative disorders. *European journal of pharmacology* 1996;297:299-306.
104. Wright JW, Kawas LH, Harding JW. A Role for the Brain RAS in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Frontiers in endocrinology* 2013;4:158.
105. Danielyan L, Lourhmati A, Verleysdonk S, et al. Angiotensin receptor type 1 blockade in astroglia decreases hypoxia-induced cell damage and TNF alpha release. *Neurochemical research* 2007;32:1489-98.



106. Holownia A, Braszko JJ. The effect of angiotensin II and IV on ERK1/2 and CREB signalling in cultured rat astroglial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2007;376:157-63.
107. Namsolleck P, Boato F, Schwengel K, et al. AT2-receptor stimulation enhances axonal plasticity after spinal cord injury by upregulating BDNF expression. *Neurobiology of disease* 2013;51:177-91.
108. Barnett SC, Linington C. Myelination: do astrocytes play a role? *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 2013;19:442-50.
109. Ransom BR, Ransom CB. Astrocytes: multitalented stars of the central nervous system. *Methods in molecular biology* 2012;814:3-7.
110. Abadir PM, Periasamy A, Carey RM, Siragy HM. Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B2 receptor functional heterodimerization. *Hypertension* 2006;48:316-22.
111. AbdAlla S, Lothar H, Quitterer U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 2000;407:94-8.
112. Barki-Harrington L, Luttrell LM, Rockman HA. Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo. *Circulation* 2003;108:1611-8.
113. Passos-Silva DG, Verano-Braga T, Santos RA. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. *Clin Sci (Lond)* 2013;124:443-56.
114. Horiuchi M, Iwanami J, Mogi M. Regulation of angiotensin II receptors beyond the classical pathway. *Clin Sci (Lond)* 2012;123:193-203.
115. D'Haese JG, Friess H, Ceyhan GO. Therapeutic potential of the chemokine-receptor duo fractalkine/CX3CR1: an update. *Expert opinion on therapeutic targets* 2012;16:613-8.
116. Nomiya H, Osada N, Yoshie O. A family tree of vertebrate chemokine receptors for a unified nomenclature. *Developmental and comparative immunology* 2011;35:705-15.
117. White GE, Greaves DR. Fractalkine: a survivor's guide: chemokines as antiapoptotic mediators. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2012;32:589-94.
118. Wu L, Paxton WA, Kassam N, et al. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *The Journal of experimental medicine* 1997;185:1681-91.

119. Samson M, Libert F, Doranz BJ, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996;382:722-5.
120. Liu R, Paxton WA, Choe S, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996;86:367-77.
121. Allers K, Hutter G, Hofmann J, et al. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Delta32/Delta32 stem cell transplantation. *Blood* 2011;117:2791-9.
122. Townson DH, Liptak AR. Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:94.
123. Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, et al. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *The Journal of biological chemistry* 2001;276:37993-8001.
124. Maciejewski-Lenoir D, Chen S, Feng L, Maki R, Bacon KB. Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX3CR-1-expressing microglia. *J Immunol* 1999;163:1628-35.
125. Harrison JK, Jiang Y, Chen S, et al. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:10896-901.
126. Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature neuroscience* 2006;9:917-24.
127. Fumagalli S, Perego C, Ortolano F, De Simoni MG. CX3CR1 deficiency induces an early protective inflammatory environment in ischemic mice. *Glia* 2013;61:827-42.
128. Huang D, Shi FD, Jung S, et al. The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *FASEB J* 2006;20:896-905.
129. Blomster LV, Brennan FH, Lao HW, Harle DW, Harvey AR, Ruitenberg MJ. Mobilisation of the splenic monocyte reservoir and peripheral CX3CR1 deficiency adversely affects recovery from spinal cord injury. *Experimental neurology* 2013;247:226-40.
130. Cho SH, Sun B, Zhou Y, et al. CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry* 2011;286:32713-22.

131. Davies NM, Kehoe PG, Ben-Shlomo Y, Martin RM. Associations of anti-hypertensive treatments with Alzheimer's disease, vascular dementia, and other dementias. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 2011;26:699-708.
132. Li NC, Lee A, Whitmer RA, et al. Use of angiotensin receptor blockers and risk of dementia in a predominantly male population: prospective cohort analysis. *Bmj* 2010;340:b5465.
133. Jing F, Mogi M, Sakata A, et al. 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.
134. Valero-Esquitino V, Monnet-Tschudi F, Honegger P, et al. Direct AT2-Receptor Stimulation Protects from Demyelination and Promotes Remyelination in an in vitro Model of Neuroinflammation. 16th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research (ECCR) 2011.
135. Apostolakis S, Vlata Z, Vogiatzi K, Krambovitis E, Spandidos DA. Angiotensin II up-regulates CX3CR1 expression in THP-1 monocytes: impact on vascular inflammation and atherogenesis. *Journal of thrombosis and thrombolysis* 2010;29:443-8.
136. 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.
137. Tassone EJ, Sciacqua A, Andreozzi F, et al. Angiotensin (1-7) counteracts the negative effect of angiotensin II on insulin signalling in HUVECs. *Cardiovascular research* 2013;99:129-36.
138. Nie W, Yan H, Li S, et al. Angiotensin-(1-7) enhances angiotensin II induced phosphorylation of ERK1/2 in mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Molecular immunology* 2009;46:355-61.
139. Zhu Z, Zhong J, Zhu S, Liu D, Van Der Giet M, Tepel M. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-induced signal transduction. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2002;40:693-700.
140. Gembardt F, van Veghel R, Coffman TM, Schultheiss HP, Danser AH, Walther T. Hemodynamic effects of vasorelaxant compounds in mice lacking one, two or all three angiotensin II receptors. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 2012;35:547-51.

141. Waldhoer M, Fong J, Jones RM, et al. A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:9050-5.
142. Augusto Oliveira F, Silveira PE, Lopes MJ, Kushmerick C, Naves LA. Angiotensin II increases evoked release at the frog neuromuscular junction through a receptor sensitive to A779. *Brain research* 2007;1175:48-53.
143. Tirapelli CR, Fukada SY, de Godoy MA, de Oliveira AM. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of angiotensin II in the isolated rat carotid. *Life sciences* 2006;78:2676-82.
144. Pawlak R, Napiorkowska-Pawlak D, Takada Y, et al. The differential effect of angiotensin II and angiotensin 1-7 on norepinephrine, epinephrine, and dopamine concentrations in rat hypothalamus: the involvement of angiotensin receptors. *Brain research bulletin* 2001;54:689-94.
145. Lemos VS, Silva DM, Walther T, Alenina N, Bader M, Santos RA. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2005;46:274-9.
146. Croitoru-Lamoury J, Guillemin GJ, Boussin FD, et al. Expression of chemokines and their receptors in human and simian astrocytes: evidence for a central role of TNF alpha and IFN gamma in CXCR4 and CCR5 modulation. *Glia* 2003;41:354-70.
147. Luo Y, Berman MA, Zhai Q, et al. RANTES stimulates inflammatory cascades and receptor modulation in murine astrocytes. *Glia* 2002;39:19-30.
148. Sohy D, Parmentier M, Springael JY. Allosteric transinhibition by specific antagonists in CCR2/CXCR4 heterodimers. *The Journal of biological chemistry* 2007;282:30062-9.
149. Lyngso C, Erikstrup N, Hansen JL. Functional interactions between 7TM receptors in the renin-angiotensin system--dimerization or crosstalk? *Molecular and cellular endocrinology* 2009;302:203-12.
150. van Rijn RM, Harvey JH, Brissett DI, DeFriel JN, Whistler JL. Novel screening assay for the selective detection of G-protein-coupled receptor heteromer signaling. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2013;344:179-88.
151. Gava E, Samad-Zadeh A, Zimpelmann J, et al. Angiotensin-(1-7) activates a tyrosine phosphatase and inhibits glucose-induced signalling in proximal tubular cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2009;24:1766-73.

152. Tao X, Fan J, Kao G, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced signaling associated with activation of a tyrosine phosphatase in Sprague-Dawley rats cardiac fibroblasts. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 2014.
153. El-Hashim AZ, Renno WM, Raghupathy R, Abduo HT, Akhtar S, Benter IF. Angiotensin-(1-7) inhibits allergic inflammation, via the MAS1 receptor, through suppression of ERK1/2- and NF-kappaB-dependent pathways. *British journal of pharmacology* 2012;166:1964-76.
154. Lehtonen JY, Daviet L, Nahmias C, Horiuchi M, Dzau VJ. Analysis of functional domains of angiotensin II type 2 receptor involved in apoptosis. *Molecular endocrinology* 1999;13:1051-60.
155. Villela D, Munter L-M, Multhaup G, et al. Evidence of a Direct Mas-AT2 Receptor Dimerization. *Journal of Hypertension Abstracts of the 24th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension*. Sydney: International Society of Hypertension; 2012.
156. AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:39721-6.
157. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, et al. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 2005;111:1806-13.
158. Quitterer U, Lothar H, Abdalla S. AT1 receptor heterodimers and angiotensin II responsiveness in preeclampsia. *Seminars in nephrology* 2004;24:115-9.
159. AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nature medicine* 2001;7:1003-9.
160. Duthey B, Caudron S, Perroy J, et al. A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric GABA(B) receptor. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:3236-41.
161. Wilson S, Wilkinson G, Milligan G. The CXCR1 and CXCR2 receptors form constitutive homo- and heterodimers selectively and with equal apparent affinities. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:28663-74.
162. AbdAlla S, Abdel-Baset A, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U. Mesangial AT1/B2 receptor heterodimers contribute to angiotensin II hyperresponsiveness in experimental hypertension. *J Mol Neurosci* 2005;26:185-92.

163. AbdAlla S, Lothar H, Langer A, el Faramawy Y, Quitterer U. Factor XIIIa transglutaminase crosslinks AT1 receptor dimers of monocytes at the onset of atherosclerosis. *Cell* 2004;119:343-54.
164. Cohn JN, Tognoni G. A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *The New England journal of medicine* 2001;345:1667-75.
165. Yekkirala AS, Lunzer MM, McCurdy CR, et al. N-naphthoyl-beta-naltrexamine (NNTA), a highly selective and potent activator of mu/kappa-opioid heteromers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:5098-103.
166. Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome. *Nature reviews* 2002;1:727-30.
167. Springael JY, Urizar E, Costagliola S, Vassart G, Parmentier M. Allosteric properties of G protein-coupled receptor oligomers. *Pharmacology & therapeutics* 2007;115:410-8.
168. Ferre S, Casado V, Devi LA, et al. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacological reviews* 2014;66:413-34.
169. Selent J, Kaczor AA. Oligomerization of G protein-coupled receptors: computational methods. *Current medicinal chemistry* 2011;18:4588-605.
170. Hansen JL, Theilade J, Haunso S, Sheikh SP. Oligomerization of wild type and nonfunctional mutant angiotensin II type I receptors inhibits galphaq protein signaling but not ERK activation. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:24108-15.
171. 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.

## 7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julia Leonhardt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur funktionellen Interaktion zwischen dem Rezeptor Mas und dem AT2-Rezeptor in primären, murinen Astrozyten“ 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](http://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/der Betreuer/in, 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.“

Berlin, den 28.05.2014

Julia Leonhardt

## Anteilerklärung an Publikationen

Julia Leonhardt hat/hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen/publizierten Vorträgen und Kongressbeiträgen:

1. Villela DC\*, **Leonhardt J\***, Muenther LM, Kirsch S, Teichmann A, Mardahl M, Lucht K, Benz V, Namsolleck P, Alenina N, Unger T, Schuelein R, Bader M, Santos RA, Steckelings UM: Molecular and functional interaction of the AT2-receptor and the receptor Mas. Status: in Vorbereitung.

\* : **gleichberechtigte Erstautorenschaft**

**Beitrag im Einzelnen:** 50%. Beteiligung an Idee und Konzept der Experimente, Methodenetablierung, Planung und Durchführung der Experimente in murinen Astrozytenzellkulturen (u.a. Kultivierung der primären Astrozyten, Rezeptornachweis, RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, real-time PCR), Statistische Auswertung, Verfassen des Manuskripts.

2. Villela DC, **Leonhardt J**, Patel N, Joseph J, Kirsch S, Unger T, Hallberg A, Bader M, Santos RA, Sumners C, Steckelings UM: Angiotensin AT2-receptor and receptor Mas: a complex liaison. Status: in Revision (zuletzt eingereicht am 07.03.2014, Clinical Science).

**Beitrag im Einzelnen:** 30%. Beteiligung an Idee und Konzept sowie dem Verfassen des Manuskripts.

3. **Leonhardt J**, Lucht K, Namsolleck P, Bader M, Villela DC, Santos RA, Unger T, Steckelings UM: Evidence For Functional Interaction Between the AT2-Receptor and the Receptor Mas. European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection, Mailand, Italien, Juni 2013. Publiziert: Journal of Hypertension 2013, Vol 31e-Supplement A, Abstract 7D.01, page e107.



**Beitrag im Einzelnen:** 80%. Beteiligung an Idee und Konzept der Experimente, Methodenetablierung, Planung und Durchführung der Experimente in murinen Astrozytenzellkulturen (u.a. Kultivierung der primären Astrozyten, Rezeptornachweis, RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, real-time PCR), Statistische Auswertung, Verfassen des Manuskripts.

4. **Leonhardt J**, Lucht K, Namsolleck P, Villela DC, Bader M, Santos RA, Unger T, Steckelings UM: The AT2-receptor and the receptor Mas – interacting receptors in murine astrocytes. European Council for Cardiovascular Research, Nizza, Frankreich, Oktober 2013.

**Beitrag im Einzelnen:** 80%. Beteiligung an Idee und Konzept der Experimente, Methodenetablierung, Planung und Durchführung der Experimente in murinen Astrozytenzellkulturen (u.a. Kultivierung der primären Astrozyten, Rezeptornachweis, RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, real-time PCR), Statistische Auswertung, Verfassen des Manuskripts.

5. Villela DC, **Leonhardt J**, Muentner LM, Lucht K, Benz V, Namsolleck P, Alenina N, Unger T, Bader M, Santos RA, Steckelings UM: Molecular and Functional Interaction of the Angiotensin AT2-Receptor and the Receptor Mas. High Blood Pressure Research Scientific Sessions. New Orleans, USA, September 2013. Publiziert: *Hypertension* 2013; 62: A464.

**Beitrag im Einzelnen:** 30%. Beteiligung an Idee und Konzept der Experimente, Methodenetablierung, Planung und Durchführung der Experimente in murinen Astrozytenzellkulturen (u.a. Kultivierung der primären Astrozyten, Rezeptornachweis, RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, real-time PCR), Statistische Auswertung.

6. Villela DC, **Leonhardt J**, Kirsch S, Teichmann A, Mardahl M, Muentner LM, Lucht K, Benz V, Namsolleck P, Alenina N, Unger T, Schuelein R, Bader M, Santos

RA, Steckelings UM: Molecular and functional interaction of the AT2-receptor and the receptor MAS. Angiotensin Gordon Research Conference Lucca, Italien, März 2014.

**Beitrag im Einzelnen:** 20%. Beteiligung an Idee und Konzept der Experimente, Methodenetablierung, Planung und Durchführung der Experimente in murinen Astrozytenzellkulturen (u.a. Kultivierung der primären Astrozyten, Rezeptornachweis, RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, real-time PCR), Statistische Auswertung.

Berlin, den 28.05.2014

Julia Leonhardt

## **8 Lebenslauf**

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



## 9 Publikationsverzeichnis

### Schriftliche Arbeiten

Villela DC\*, **Leonhardt J\***, Muentler LM, Kirsch S, Teichmann A, Mardahl M, Lucht K, Benz V, Namsolleck P, Alenina N, Unger T, Schuelein R, Bader M, Santos RA, Steckelings UM: Molecular and functional interaction of the AT2-receptor and the receptor Mas. Status: in Vorbereitung.

\* : **gleichberechtigte Erstautorenschaft**

Villela DC, **Leonhardt J**, Patel N, Joseph J, Kirsch S, Unger T, Hallberg A, Bader M, Santos RA, Summers C, Steckelings UM: Angiotensin AT2-receptor and receptor Mas: a complex liaison. Status: in Revision (zuletzt eingereicht am 07.03.2014, Clinical Science).

### Kongressbeiträge (Vorträge)

**Leonhardt J**, Lucht K, Namsolleck P, Bader M, Villela DC, Santos RA, Unger T, Steckelings UM: Evidence For Functional Interaction Between the AT2-Receptor and the Receptor Mas. European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection, Mailand, Italien, Juni 2013. Publiziert: Journal of Hypertension 2013, Vol 31e-Supplement A, Abstract 7D.01, page e107.

**Leonhardt J**, Lucht K, Namsolleck P, Villela DC, Bader M, Santos RA, Unger T, Steckelings UM: The AT2-receptor and the receptor Mas – interacting receptors in murine astrocytes. European Council for Cardiovascular Research, Nizza, Frankreich, Oktober 2013.

**Kongressbeiträge (Poster)**

Villela DC, **Leonhardt J**, Muenther LM, Lucht K, Benz V, Namsolleck P, Alenina N, Unger T, Bader M, Santos RA, Steckelings UM: Molecular and Functional Interaction of the Angiotensin AT2-Receptor and the Receptor Mas. High Blood Pressure Research Scientific Sessions. New Orleans, USA, September 2013. Publiziert: *Hypertension* 2013; 62: A464.

Villela DC, **Leonhardt J**, Kirsch S, Teichmann A, Mardahl M, Muenther LM, Lucht K, Benz V, Namsolleck P, Alenina N, Unger T, Schuelein R, Bader M, Santos RA, Steckelings UM: Molecular and functional interaction of the AT2-receptor and the receptor MAS. Angiotensin Gordon Research Conference Lucca, Italien, März 2014.

## 10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Steckelings und Herrn Prof. Dr. med. Unger am *Center for Cardiovascular Research* der Charité Berlin. Sie war Teil der Untersuchungen zur Erforschung des AT2-Rezeptors und seiner Rolle im Renin-Angiotensin-System.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. med. Steckelings und Herrn Prof. Dr. med. Unger bedanken, die mir die Durchführung meiner Doktorarbeit ermöglicht und mich stets hervorragend betreut haben.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Pawel Namsolleck für die wertvollen Anregungen und die ständige hilfreiche Präsenz in unserem Projekt.

Frau Kristin Lucht danke ich ganz herzlich für die stets hervorragende technische Unterstützung und ihr Organisationstalent im Labor.

Nicht zuletzt gebührt mein herzlicher Dank meiner Mutter und meinen Freunden Daniela Zaade, Patrick Hofmann, Susann Kinzelmann und Björn Walther, die mir viele wertvolle Anregungen bei der schriftlichen Gestaltung der Arbeit und moralische Unterstützung auf dem gesamten Weg zur Promotion gaben.

Außerdem möchte ich dem gesamten CCR meinen Dank für das anregende wissenschaftliche Umfeld, die schöne Forschungszeit, die vielen netten Gespräche und das angenehme Arbeitsklima aussprechen.