

Aus dem Institut für Pharmakologie
(Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med T. Herdegen)
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Die Angiotensin II AT₂-Rezeptor vermittelte
funktionelle und morphologische Regeneration
peripherer Nerven am Modell der experimentellen
Läsion des Nervus ischiadicus der Ratte**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Kirstin Reinecke

aus Göttingen

Kiel 2004

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1-34
1.1 Neuronale Regeneration	2
1.1.1 Neuronaler Regenerationsprozesse auf zellulärer Ebene	3
1.1.2 Interaktionen von regenerierenden Axonen mit angrenzenden Strukturen	6
1.1.3 Pathophysiologie unterschiedlicher Nervenläsionen	6
1.1.4 Apoptose und Nekrose bei Nervenläsionen	8
1.2. Renin-Angiotensin-System	10
1.2.1 Historischer Überblick	10
1.2.2 Physiologie des Renin-Angiotensin-Systems	11
1.2.3 Das Renin-Angiotensin-System in Schwann-Zellen	13
1.2.4 Die Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems	13
1.2.4.1 Renin	13
1.2.4.2 Angiotensinogen	13
1.2.4.3 Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE)	14
1.2.4.4 Angiotensin II.	15
1.2.4.5 ANG II-Rezeptoren	16
1.2.4.5.1 Der AT ₁ -Rezeptor	17
1.2.4.5.2 Der AT ₂ -Rezeptor	18
1.2.5 Der AT ₁ -Rezeptor-Antagonist Losartan	22
1.2.6 Der AT ₂ -Rezeptor-Antagonist PD 123319	23
1.3 Pathophysiologie von AT₁- und AT₂-Rezeptoren im Nervensystem.	23
1.3.1 Funktion des AT ₁ -Rezeptors am Nerven	23
1.3.2 AT ₂ Rezeptoren und neuronale Entwicklung	24
1.3.3 AT ₂ -Rezeptoren und neuronale Regeneration	27
1.3.4. Zelltypspezifische Expression von AT ₂ -Rezeptoren	30
1.4 Zielsetzung	33

3. <u>ERGEBNISSE</u>	52-71
3.1 Experimentelles Modell zur lokalen Wirkstoffadministration	52
3.1.1 Pumpleistung	52
3.1.2 ANG II-Stabilität bei Körpertemperatur	53
3.2 <i>In vivo</i> Regenerationsverlauf	54
3.2.1 Fußspannenanalyse	54
3.2.1.1 Konzentrationsabhängige Beeinflussung durch ANG II	56
3.2.1.2 Rezeptoranalyse bei exogen-appliziertem ANG II	57
3.2.1.3 Endogenes ANG II	58
3.2.1.4 Kombinierte Blockade von AT ₁ - und AT ₂ -Rezeptoren	58
3.2.1.5 Einfluss einer zeitlich verlängerten ANG II-Applikation	59
3.2.2 Sensomotorische Funktion nach Elektrostimulation	60
3.2.2.1 Konzentrationsabhängige Beeinflussung durch ANG II	60
3.2.2.2 Rezeptoranalyse bei exogen-appliziertem ANG II	61
3.2.2.3 Endogenes ANG II	63
3.2.2.4 Kombinierte Blockade von AT ₁ - und AT ₂ -Rezeptoren	64
3.3 Histologische Auswertung	65
3.3.1 GAP-43 Färbung	65
3.3.2 Myelinscheidenfärbung	67
3.3.3 Elektronenmikroskopische Analyse entnommener Nervensegmente	69
3.3.4 Morphometrische Analyse der lichtmikroskopischen Bilder	69
3.3.4.1 Durchmesser der Axonkaliber	70
3.3.4.2 Myelinisierungsgrad	70
4. <u>DISKUSSION</u>	72-97
4.1 Experimentelles Modell	72
4.1.1 Modell zur lokalen Wirkstoffadministration	72
4.1.2 ANG II-Stabilität in Lösung	73
4.1.3 Der neurotrophe Faktor NGF als Positivkontrolle	73
4.1.4 Funktionelle Parameter der Nervenregeneration im verwendeten Modell	75
4.1.4.1 Fußspannenanalyse	75
4.1.4.2 Sensomotorische Funktion nach Elektrostimulation	76

4.1.5 Morphologische Parameter der neuronalen Regeneration	78
4.1.5.1 GAP-43-Färbung	78
4.1.5.2 Axondurchmesser, Myelinscheidendicke und Anzahl der myelinisierten Axone.	79
4.2 Einfluss von ANG II auf die neuronale Regeneration <i>in vivo</i>	81
4.2.1 Konzentrationsabhängigkeit einer neurotrophen ANG II-Wirkung	81
4.2.1.1 Konzentrationsabhängige Mechanismen	82
4.2.2 Induktion von Apoptose nach experimenteller Nervenläsion	85
4.2.2.1 Dichotomien von Nervenläsionen in Regeneration oder Apoptose	86
4.2.2.2 Angiotensin II und Apoptose.	87
4.2.2.2.1 Der AT ₂ -Rezeptor und Apoptose	89
4.2.2.2.2 Der AT ₁ -Rezeptor und Apoptose	92
4.2.3 Modulation der Nervenregeneration durch die Extrazellulärmatrix	94
4.2.4 Modulation der Nervenregeneration durch Vaskularisierung	95
4.2.5 Maximale Nervenregeneration bei verlängerter ANG II-Applikation	96
5. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	98-101
6. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	102-130
7. <u>DANKSAGUNG</u>	131
8. <u>LEBENS LAUF</u>	132
9. <u>KONGRESSBEITRÄGE UND PUBLIKATIONEN</u>	133

Abkürzungen

ACE	Angiotensin-Konversionsenzym
ANG II	Angiotensin II (ANG 1-8)
ANG III	Angiotensin III (ANG 2-8)
ANG IV	Angiotensin IV (ANG 3-8)
AT ₁ , AT ₂	Angiotensin Rezeptor Typ 1, Typ 2
Bcl-2	“B-cell lymphoma 2 gene”
BDNF	“brain-derived neurotrophic factor”
BSA	Bovines-Serum-Albumin
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CNTF	“ciliary neurotrophic factor”
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EZM	Extrazellulärmatrix
EGF	“epidermal growth factor”
ERK	“extracellular-signal-regulated kinase”
FGF	“fibroblast growth factor”
GAP-43	“growth-associated protein-43”
IgG	Immunglobulin G
JNK	c-Jun NH ₂ -terminale Kinase
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NF	Neurofilamente
NFκ-B	nuklearen Transkriptionsfaktors-κB
NF-M	Neurofilament-Untereinheit (160kDa)
NG108-15	Neuroblastoma-Glioma-Zelllinie 108-15
NGF	“nerve growth factor”
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC12W	Phäochromozytom-Zelllinie
PDGF	“platelet derived growth factor”
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PN-1	Protease Nexin-1
PNS	peripheres Nervensystem
PP2A	Serin/Threonin-Phosphatase 2A
PTPasen	Phosphotyrosin-Phosphatasen
RAS	Renin-Angiotensin-System
RIA	Radioimmuno-Assay
R3T3-Zellen	Fibroblasten-3T3-Zellen
SHP-1	lösliche Phosphatase-1
TGF-β	“transforming growth factor-β”
TNF	Tumor Nekrosefaktor
Trk B	Tyrosinkinase Rezeptor B
TRIS	Tris-hydroxymethylaminomethan
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Die Fähigkeit zur Nervenregeneration ist eine fundamentale Anpassung niederer Vertebraten (Fische, Amphibien) sowie neugeborener Säugetiere und stellt einen deutlichen Überlebensvorteil dar. Dieser Fähigkeit ist bei höheren Vertebraten (Säugetiere, Vögel) nur noch bedingt vorhanden. Bei Säugtieren ist die Möglichkeit einer funktionellen Regeneration des zentralen Nervensystems weitestgehend verlorengegangen. Eine Regeneration nach Verletzung des peripheren Nervensystems ist jedoch meistens auch bei höheren Vertebraten erfolgreich. Viele der zellulären Mechanismen, wie z.B. intrinsische regenerative Fähigkeit peripherer Axone, Leukozyteninfiltration mit anschließender Entfernung von nekrotischem Gewebe und Myelintrümmern sowie Ausdehnung axonaler Wachstumskegel entlang proliferierender Schwann-Zellen (Büngnersche Bänder; Übersicht bei *Tonge und Golding, 1993; Fawcett und Keynes, 1990*) sind bereits gut bekannt. Allerdings birgt die nur langsame Regeneration von Nerven eine ernst zunehmende klinische Gefahr für den Menschen. Besonders bei proximalen (nahe dem Rückenmark lokalisierten) Nervenverletzungen werden möglicherweise Jahre benötigt, bis die Nerven wieder zu ihrem ursprünglichen Innervationsgebiet aussprossen. Eine andauernde Denervation resultiert in Atrophie und Degeneration der betroffenen sensorischen wie motorischen Endorgane. Ein kompletter Muskelfaserverlust führt möglicherweise zum irreparablen, permanenten Funktionsverlust. Daher ist es potentiell von großer therapeutischer Bedeutung, Identität wie Mechanismus endogener Faktoren peripherer Nerven, die Einfluss auf die Regenerationsrate haben, möglichst vollständig aufzuschlüsseln.

In jüngeren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch dem Renin-Angiotensin-System innerhalb der neuronalen Regeneration eine wichtige Funktion zukommt (Übersicht bei *Lucius et al., 1999; Blume et al., 2001*).

1.1 Neuronale Regeneration

Im folgenden soll vor allem auf die neuronale Regeneration höherer Vertebraten eingegangen werden.

Hier kann grundsätzlich unterschieden werden zwischen:

- a) Regeneration im zentralen Nervensystem und
- b) Regeneration im peripheren Nervensystem.

Im Gegensatz zum peripheren Nervensystem ist im zentralen Nervensystem (ZNS) adulter Säuger, von einigen Ausnahmen abgesehen, keine axonale Regeneration möglich (Übersicht bei: *Aguayo, 1985; Aubert et al., 1995*). Nach einer Läsion sterben zunächst die unmittelbar geschädigten Neurone ab, während Nervenzellen mit verletzten Axonen, aber unversehrtem Perikaryon, im Verlauf der sogenannten retrograden Degeneration absterben.

Die ausbleibende Regeneration im adulten ZNS im Vergleich zum unreifen ZNS bzw. adulten peripheren Nervensystem ist einerseits auf die gliale Umgebung der Neurone zurückzuführen, nämlich die Abwesenheit oder ungenügende Produktion neurotropher Faktoren (z.B. Nervenwachstumsfaktor, "brain-derived neurotrophic factor"), die Anwesenheit inhibierender Moleküle (z.B. Moleküle der Extrazellulärmatrix wie Tenascin oder von Oligodendrozyten gebildete Proteine der NOGO-Familie) und andererseits die Unfähigkeit der Nervenzellen, embryonal vorhandene, wachstumsassoziierte Programme reaktivieren zu können (z.B. Gen-Expression von GAP-43, Expression von Zelloberflächenproteinen). Zu einem späteren Zeitpunkt wird zusätzlich durch den Aufbau einer Glianarbe eine physikalische und chemische Barriere errichtet, die von den aussprossenden Axonen nicht überwunden werden kann.

Physiologischerweise besteht eine dauerhafte und permanente Verbindung von peripheren Nerven mit ihren Zielgebieten. Periphere Nerven stellen hierbei nicht nur ein statisches Gebilde dar, sondern eine morphologische Einheit mit einer Vielzahl von komplexen Funktionen. Sie modellieren Wachstum und Reifung der in ihnen verhafteten Neurone (*Purves und Voyvodic, 1987*), produzieren und transportieren viele der hierfür notwendigen Moleküle und sind somit an der Übermittlung einer Vielzahl von biologischen Interaktionen beteiligt, die in ihrer Komplexität bis heute nur teilweise bekannt sind (*Gillen et al., 1997; Lasek et al., 1984*).

Nach einer axonalen Verletzung wird der distale Nervenstumpf durch einen Prozess abgebaut, der „Wallerische Degeneration“ genannt wird. Dabei finden neben Abbaumechanismen im verletzten Axon auch Interaktionen mit dem umgebenden Interstitium und benachbarten

Zellen statt, wodurch für eine Wiederaussprossung des regenerierenden Axons günstige Bedingungen geschaffen werden. Zunächst wird das axonale Material und das Myelin entfernt bzw. wiederverwertet. In der Basallamina bleiben Schwann-Zellen zurück, die sich erst dedifferenzieren, dann proliferieren und die sogenannten „Büngnerschen Bänder“ ausbilden. Makrophagen, die hauptsächlich für den Abbau des Axonmaterials sorgen, produzieren *in vitro* ein konditionierendes Medium, welches ebenso wie der Verlust des Axonkontaktes proliferationsfördernd auf Schwann-Zellen wirkt (Baichwal et al., 1988). Weiterhin ist beschrieben worden, dass sich Makrophagen am distalen Nervenstumpf ansammeln, bevor die Proliferation der Schwann-Zellen einsetzt. Die Proliferation von Schwann-Zellen scheint die Beteiligung von Makrophagen zu benötigen, obwohl der zu Grunde liegende Mechanismus noch nicht geklärt ist. Makrophagen sezernieren bekanntermaßen eine Anzahl von Faktoren, u.a. „platelet derived growth factor“ (PDGF), „transforming growth factor-β“ (TGF-β) und Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs), welche *in vitro* auf Schwann-Zellen eine mitogene Wirkung entfalten, sowie weitere noch zu identifizierende Faktoren (Grothe und Nikkhah, 2001).

Axone innerhalb des proximalen Stumpfes gequetschter oder durchtrennter Nerven beginnen innerhalb weniger Stunden nach Verletzung, Wachstumskegel zu bilden; dies geschieht gewöhnlich an einem Ranvierschen Schnürring nahe der Transsektionsstelle, wobei das initiale Stadium dieses Prozesses durch lokale Faktoren kontrolliert wird (Tonge und Golding, 1993).

1.1.1 Neuronale Regenerationsprozesse auf zellulärer Ebene

Periphere Nervenverletzungen bei Säugetieren führen zu einem komplexen aber stereotypischen Muster histologischer Ereignisse, bestehend aus einer hoch reproduzierbaren Sequenz degenerativer Reaktionen (Wallersche Degeneration), gefolgt von regenerativen Antworten. Diese Reaktionen basieren auf korrespondierenden Sequenzen zellulärer und molekularer Interaktion. Dies wiederum reflektiert die differentiale Expression spezifischer Gene mit Funktion innerhalb der Nervendegeneration und –regeneration. Die Gruppe der regulierenden Gene umfasst u.a. Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, Zytokine, Neuropeptide, Myelinproteine, Lipidtransporter, Zytoskelettproteine sowie Extrazellulärmatrix- und Zelladhäsionsproteine (Clemens et al., 1997).

Das morphologische Hauptereignis der Zelldegeneration ist die Chromatolyse: Die Verstreuung von Nissl-Substanz aufgrund der Auflösung großer granulärer Zusammenschlüsse des rauen Endoplasmatischen Retikulums. Welche präzisen Veränderungen sich ereignen, wie schnell und für wie lange, ist hierbei u. a. abhängig von

Faktoren wie Alter und Abstand der Läsion vom Zellkörper (Übersicht bei *Cragg, 1970; Grafstein und Mc Quarrie 1978; Liebermann, 1971*).

Am Anfang der axonalen Regeneration durchlaufen die Neurone zunächst eine Dedifferenzierung. Es kommt zu einer dreidimensionalen Reduktion, die sich in Verkürzung des Dendritenbaums (*Yawo, 1987*) und der Schrumpfung des axonalen Durchmessers des proximalen Stumpfes äußert. Während dieser morphologischen Umstrukturierung entspricht das morphologische Erscheinungsbild axotomierter Neurone zunehmend dem einer sich noch in der embryonalen Entwicklung befindlichen Nervenzelle.

Der Elongationsprozess von Neuriten während der axonalen Regeneration ausdifferenzierter Neuronen ist von der Bildung eines stabilen Mikrotubuli-Gittergerüsts abhängig, das eine transiente Änderung im Expressionsmuster und/oder der Lokalisation spezifischer Zytoskelettproteine wie Aktin (*Tezloff et al., 1988*) und Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) (*Svensson und Aldskogius, 1992; Woodhams et al., 1989*) hervorruft. Kritisch innerhalb dieses Prozesses ist die Interaktion zwischen den Tubulin-Polymeren und den MAPs (*Bohm et al., 1990*). Die meisten MAPs zeigen während der Entwicklung ein unterschiedliches Profil bezüglich ihrer Expression und zellulären Lokalisation, welches mit den jeweiligen Entwicklungsschritten korreliert (*Matus, 1988*).

Während der Wallerschen Degeneration findet eine Expressionsänderung vieler zellulärer Proteine innerhalb der Nervenscheiden statt. Auch hier zeigen sich Expressionsmuster, die denen der Embryonalphase ähnlich sind. Eine biochemische Analyse während der Nervenregeneration hat gezeigt, dass etliche Faktoren an der neuronalen Regeneration beteiligt sind (*Sunderland, 1990*). Die erste Gruppe beinhaltet die neurotrophen Faktoren, innerhalb derer der Nervenwachstumsfaktor (NGF) den am besten charakterisierten darstellt. Weitere Faktoren umfassen Hormone, neuritenfördernde Faktoren und Matrixfaktoren.

Neurotrophe Faktoren werden vom distalen Nervenstumpf verletzter peripherer Nerven freigesetzt. Es kommt zur erhöhten Expression von NGF in Fibroblasten und Schwann-Zellen der Nervenscheide. Die NGF-Expression wird im distalen Stumpf innerhalb der ersten wenigen Tage durch Interleukin-1 stimuliert, welches von Makrophagen freigesetzt wird (*Mayer et al., 1992*). NGF wird retrograd mittels eines schnellen Transportsystems im Axon transportiert (*Thoenen et al., 1988*). Er stimuliert ausschließlich sensorisches (*Fernandez et al., 1990; Lindholm et al., 1987, Lindsay, 1988*) und sympathisches Neuritenwachstum, beides, *in vitro* wie *in vivo*, und im ZNS (*Hagg et al., 1991*). Regenerative Prozesse von Motoneuronen werden nicht beeinflusst (*Campanot, 1981; Rich et al., 1989*).

Während der Wallerschen Degeneration ist ebenfalls die Synthese von „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) in Schwann-Zellen erhöht. Der Anstieg erfolgt allerdings langsamer im Vergleich zur NGF-Expression. Gemessen an der mRNA ist das Ausmaß der BDNF-Expression allerdings größer als bei NGF. Die BDNF-Expression ist nicht durch Interleukin-1 oder andere Makrophagensekrete regulierbar (*Tonge und Golding, 1993*).

Ein dritter bedeutungsvoller Faktor, der trophische Effekte auf eine Vielzahl von Neuronen ausübt, ist „ciliary neurotrophic factor“ (CNTF). Dieser ist im Zytoplasma myelinierter Schwann-Zellen adulter Tiere präsent (*Sendtner et al., 1992*). Während der Wallerschen Degeneration ist die CNTF-Synthese reduziert. Es werden allerdings die zytosolischen Speicher entleert, und somit verbleiben physiologisch signifikante Mengen im extrazellulären Raum der Nerven (*Sendtner et al., 1992*).

„Insulin-like growth factor-1“ (IGF-1) konnte im proximalen wie distalen Nervenstumpf nachgewiesen werden (*Hansson et al., 1986; Kanje et al., 1989*). Dieser neurotrophe Faktor wird von den Schwann-Zellen produziert, die an der peripheren Nervenregeneration beteiligt sind.

Eine weitere wichtige Rolle im neuronalen Regenerationsprozess spielt das axonal transportierte Phosphoprotein „growth-associated protein-43“ (GAP-43). Es kommt auf der Innenseite der Membran regenerierender und auswachsender Axone vor, insbesondere nahe des Wachstumskegels (*Meiri et al., 1988*). Es konnte bereits wenige Stunden nach Axotomie eine bis zu 100-fach erhöhte Proteinexpression für GAP-43 in den Axonen gemessen werden, die nach Reinnervation wieder auf das nervale Grundniveau zurückgeht (*Karns et al., 1987; Skene et al., 1986, Verhaagen et al., 1988*).

Auch die Gruppe der Hormone fördert axonales Wachstum. Hierbei müssen Schilddrüsenhormone, Östrogen, Testosteron, Corticotropin, adrenocorticotropisches Hormon-ähnliche Peptide und Insulin genannt werden (*Bijlsma et al., 1984; Seckel, 1990*). Die Wirkmechanismen dieser Hormone bei der Nervenregeneration sind variabel und derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Sie sind jedoch unabhängig von ihrer klassischen endokrinen Aktivität.

Bei den neuritenfördernden Faktoren der Extrazellulärmatrix handelt es sich um Glykoproteine, die an die Basallamina von Schwann-Zellen und an die Extrazellulärmatrix gebunden sind. Diese Moleküle, wie Laminin, Fibronectin und neuronale Zelladhäsionsmoleküle, fördern das axonale Wachstum durch einen Leitschieneneffekt (*Lander, 1987, Seckel, 1990*) und helfen den wachsenden Axonen bei der longitudinalen Orientierung im peripheren Nervenstrang.

1.1.2 Interaktionen regenerierender Axone mit angrenzenden Strukturen

Zur Umgebung regenerierender Axone im peripheren Nervensystem gehören Schwann-Zellen und ihre Basallamina, Fibroblasten, Kollagen, sowie anfangs axonale Trümmer, degenerierendes Myelin und phagozytierende Zellen. Das axonale Wachstum wird hauptsächlich durch Schwann-Zellen gefördert. Fehlen Schwann-Zellen im direkten Umfeld regenerierender Axone, ist ein axonales Wachstum nicht möglich bzw. deutlich reduziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Schwann-Zellen-Basallamina, welche aus Laminin und Fibronectin besteht, ihrerseits einen potenten Promotor des Neuritenwachstums in Kultur darstellt (*Bozyczko und Horwitz, 1986; Rogers et al., 1983*).

Die übrigen Komponenten im verletzten Nerven, Fibroblasten (Perineuralzellen) und Basallamina, sind für eine axonale Regeneration alleine nicht ausreichend (*Fawcett und Keynes, 1990*).

1.1.3 Pathophysiologie unterschiedlicher Nervenläsionen

Die Folgen einer axonalen Verletzung werden sowohl durch den Ort als auch die Art der Verletzung entscheidend mitbestimmt. Erfolgt eine Läsion proximal zum Zellkörper, so beobachtet man eine starke Zellkörperreaktion, die nicht nur mit einer großen regenerativen Potenz, sondern gleichzeitig auch mit einer großen Gefahr der Apoptose verbunden ist (*Abbildung 1*). Bei einer distalen Nervenläsion bedingt die schwache Zellkörperreaktion nicht nur eine geringere Chance zur Wiederherstellung der Nervenfunktion, sondern auch eine geringe Gefahr des programmierten Zelltodes (Übersicht bei *Herdegen et al., 1997*).

Es können verschiedene Arten von Nervenläsionen unterschieden werden. Bei einer Durchtrennung des Axons (Axotomie) und nachfolgender Ligation besteht keine Möglichkeit zur funktionellen Nervenregeneration, während nach einer Nervenquetschung der periphere Nerv seine Funktion wiedererlangen kann. Dieses ist möglich, da nach der Nervenquetschung die Basallamina zusammen mit den Büngnerschen Bändern erhalten bleibt und die aussprossenden Axone damit die Möglichkeit besitzen, die topographisch richtigen Zielregionen anhand dieser noch existierenden Leitschienen zu reinnervieren.

Der Erfolg der Nervenregeneration hängt demnach davon ab, ob

- der Abstand zwischen proximalem Segment und dem folgenden Abschnitt von den aussprossenden Fortsätzen überbrückt werden kann,
- die Sprosse das zugehörige ehemalige Nervenfaserbündel erreichen, das jetzt aus Schwann-Zellen und Basalmembran besteht, und somit die korrekte Reinnervation des Zielgebietes ermöglicht,
- die Schädigungen des Effektororgans, zu denen es durch die fehlende Innervation gekommen ist (z.B. Inaktivierungstrophie eines Muskels), reversibel sind.

Misserfolge der Nervenregeneration können eintreten (Übersicht bei *Junqueira und Carneiro, 1991*), wenn

- zwischen proximalem und distalem Stumpf eine unüberwindbare Bindegewebeverdichtung (Narbe) entsteht. Dann können die auswachsenden Nervenfasern eine schmerzhafte, aufgetriebene Struktur bilden, das Neurom. Gleiches kommt vor, wenn z.B. nach einer Amputation das distale Segment vollständig fehlt;
- Nervenfasern falscher Qualität in ein Büngner-Band einwachsen, z.B. wenn bei Verletzung gemischter Nerven (sensorische und motorische) sensorische Fasern in eine Zellsäule gelangen, die zu einer motorischen Endplatte führt.

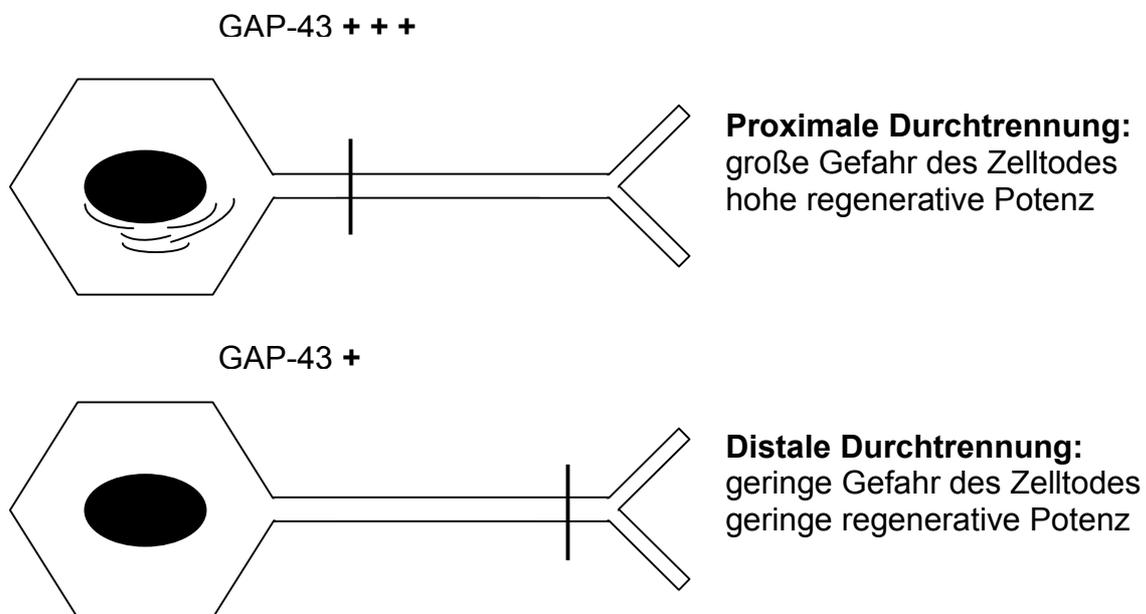


Abbildung 1: Dichotomie zwischen neuronaler Regeneration und Apoptose nach Verletzung von Neuronen (GAP-43 = growth associated protein-43) (modifiziert nach Herdegen et al., 1997).

1.1.4 Apoptose und Nekrose bei Nervenläsionen

Die Apoptose als programmierter Zelltod stellt für multizelluläre Organismen während der Entwicklung einen wichtigen Vorgang zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase dar. So ist bekannt, dass bei der Entwicklung des Nervensystems ca. 70% der Neurone durch Apoptose absterben.

Basierend auf morphologischen Befunden wird zwischen dem programmierten Zelltod als einem aktiven und dem nekrotischen Zelltod als einem passiven Geschehen unterschieden (*Kerr et al., 1972*). Morphologisch ist der apoptotische Zelltod durch die Abfolge von Chromatinkondensation, Kernfragmentierung (Pyknose), Zellschrumpfung, Zerfall in kleine von Plasmamembran umgebene Fragmente („apoptotic bodies“) und auch durch das Fehlen inflammatorischer Prozesse charakterisiert. Das Vorhandensein eines einzelnen der hier genannten Ereignisse alleine liefert jedoch noch keinen hinreichenden Beweis für das Vorliegen eines apoptotischen Prozesses, so dass für die Identifizierung apoptotischer Zellen mehrere Methoden zur Anwendung kommen müssen. Selbst die internukleosomale DNA-Fragmentierung ist kein ausreichender Beweis für die Apoptose (Übersicht bei *Umansky, 1996*). Zwar geht der programmierte Zelltod häufig mit diesen DNA-Degradierungen einher (*Brown et al., 1993; Walker et al., 1991, 1997*), dennoch gibt es auch Beispiele für apoptotischen Zelltod ohne DNA-Fragmentierungen (*Tomei et al., 1993*), für das Auftreten hochmolekularer DNA-Fragmente (*Oberhammer et al., 1993*) oder für die Existenz derartiger DNA-Fragmentierungen bei nekrotischen Prozessen (*Kataoka et al., 1995*).

Die „apoptotic bodies“ bilden die Grundlage für die Bezeichnung dieser Form des Zelltodes. Für den Ursprung dieses aus dem Griechischen stammenden Wortes gibt es verschiedene Deutungsmöglichkeiten: *απο-τωσις* bedeutet „davon Ab- oder Wegfallen“, *ἀπ-οπτος* bedeutet „von fern gesehen, sichtbar“.

Apoptotische Zellen werden *in vivo* ohne begleitende Entzündungsreaktion von den umgebenden Zellen phagozytiert, da die Integrität der Plasmamembran und der Zellorganellen während dieses Suizidprogramms erhalten bleibt und das Austreten intrazellulärer Bestandteile und Entzündungsmediatoren weitgehend verhindert wird. Apoptose kann punktuell auftreten, ohne gesunde Nachbarzellen zu beschädigen. Dies steht im Gegensatz zum nekrotischen Zelltod, bei dem es frühzeitig zur Schwellung der Zelle mit nachfolgender Ruptur der Plasmamembran kommt. Aufgrund der dadurch bedingten Entzündungsreaktion findet meist ein massiver Zelluntergang im betroffenen Gewebe statt.

Da sich Nekrose und Apoptose sowohl biochemisch als auch strukturell voneinander unterscheiden, wurden sie zunächst als zwei getrennte Formen des Zelltodes klassifiziert.

Inzwischen gibt es Hinweise darauf, dass diese scharfe Trennung so nicht aufrecht erhalten werden kann und man zumindest beim akuten, traumatischen Zelltod vielmehr oftmals von einem Kontinuum zwischen beiden Extremen auszugehen hat (*Martin et al., 1998; Portera-Cailliau et al., 1997*).

Der physiologisch auftretende, apoptotische Zelltod ist nicht nur für die Aufrechterhaltung einer konstanten Größe und Zellzahl in proliferativen Geweben, wie der Haut, den Darmepithelien, dem Immunsystem von fundamentaler Bedeutung, sondern spielt auch während der Entwicklung des peripheren und zentralen Nervensystems eine entscheidende Rolle. Neuronale Apoptose findet beispielsweise vermehrt zum Zeitpunkt der Genese von Synapsen statt (*Mattson, 2000*). Für das Schicksal der einzelnen Neurone scheint auch die limitierte Versorgung mit neurotrophen Faktoren, die das Überleben und Wachstum von Nervenzellen fördern, sowie die Aktivität von Rezeptoren des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat bedeutsam zu sein, weil dadurch in der Zelle anti-apoptotische Signalwege aktiviert werden können (*Lewin und Barde, 1996*).

Pathophysiologische Bedingungen, die einen Untergang von einer oder mehreren Nervenzellpopulationen bewirken, finden sich bei vielen akuten und chronischen neurobiologischen Erkrankungen. Viele Kriterien für den apoptotischen Zelltod sind auch bei chronisch neurodegenerativen Krankheiten erfüllt, wie z.B. Morbus Parkinson, Morbus Huntington, amyotrophe Lateralsklerose und Morbus Alzheimer (Übersicht bei *Kermer und Bähr, 2002*).

Obwohl es wahrscheinlich verschiedene Signalwege gibt, die Apoptose auslösen können, sind bislang nur zwei im Detail untersucht worden. Vereinfachend werden der extrinsische und intrinsische Apoptosesignalweg, zwischen denen es mehrere Querverbindungen gibt, unterschieden. Während der extrinsische Weg durch die Aktivierung von Zytokinrezeptoren der Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie an der Zelloberfläche initiiert wird, hängt der intrinsische Weg von der Integrität und Funktion der Mitochondrien innerhalb der Zelle ab (*Reed, 2000*). Beide Wege münden in einer Aktivierung der apoptotischen Reaktionskaskade über die Protease Caspase-3 mit nachfolgendem Zelltod.

1.2 Renin-Angiotensin-System

1.2.1 Historischer Überblick

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ein seit langem bekanntes Hormonsystem. Bereits im Jahre 1898 entdeckten Tigerstedt und Bergmann eine Substanz aus Kaninchennierenextrakt, mit der eine Blutdrucksteigerung ausgelöst werden konnte: Renin. In den folgenden Jahren schlossen sich zahlreiche Experimente an, welche die physiologische und biochemische Charakterisierung sowie das Verständnis der enzymatischen Eigenschaften der Endopeptidase vorantrieben (Übersicht bei *Inagami et al., 1988; Peart, 1991*). Als nächster Baustein des Systems wurde Angiotensinogen als Renin-Substrat beschrieben und damit das RAS als funktionelle Einheit begriffen. Zunächst herrschte allerdings die Meinung vor, dass das Spaltprodukt von Angiotensinogen, das Dekapeptid Angiotensin I, für die Vasokonstriktion verantwortlich sei. Diese Ansicht wurde Mitte der fünfziger Jahre von Skeggs und Mitarbeitern (*1956*) widerlegt, als von ihnen das Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) in der Lunge identifiziert wurde. ACE katalysiert die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II (ANG II), das wiederum die Wirkung des RAS vermittelt. Der physiologische Zusammenhang zwischen dem RAS und einer durch ANG II stimulierten Aldosteron-Freisetzung aus der Zona glomerulosa der Nebenniere und damit verstärkter Natriumretention wurde im Jahre 1965 von Gross publiziert. In jüngerer Zeit wird nun auch von der Existenz lokaler RAS in verschiedenen Organen, u.a. auch den an der Blutdruckregulation beteiligten – wie Herz, Gefäßwand, Niere, Nebenniere und Gehirn ausgegangen (*Campbell, 1987; Dzau, 1988a,b; Unger et al., 1988*). Manche Autoren berichten darüber hinaus, dass die Regulation der gewebeständigen RAS verschieden und unabhängig von der Regulation des zirkulierenden RAS ist (*Lee et al., 1996*).

An dieser Stelle sei weiterhin angemerkt, dass das Verständnis von Physiologie, Modulation und Komplexität des RAS in den letzten Jahren eine erneute Erweiterung erfahren hat: Obwohl seit längerem angenommen worden war, dass alle wesentlichen Komponenten des RAS bekannt seien, wurde im Jahre 2000 das ACE2 entdeckt (*Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000*). Für dieses neuentdeckte Enzym haben kürzlich Crackower und Mitarbeiter gezeigt, dass es x-chromosomal codiert und von Bedeutung für die Regulation myokardialer Funktionen in Mäusen sowie möglicherweise für die Pathogenese der arteriellen Hypertonie bei verschiedenen hypertensiven Rattenstämmen ist (*Crackower et al., 2002*).

Da aber zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch zahlreiche offene Fragen hinsichtlich der genaueren biologischen Wirkung und Regulation von ACE2 bestehen, kann in dieser Dissertation hierauf noch nicht näher eingegangen werden. Im folgendem werden daher außer einer kurzen Beschreibung der ACE2-vermittelten Effekte, ausschließlich die bisher gut charakterisierten und physiologisch relevanten Komponenten des RAS beschrieben.

1.2.2 Physiologie des Renin-Angiotensin-Systems

Das RAS übt eine Vielzahl von Wirkungen aus, die für die Regulation des Blutdruckes sowie des Volumen- und Elektrolythaushaltes von Bedeutung sind. ANG II, das wichtigste Effektorhormon des RAS, entfaltet seine Wirkungen im wesentlichen über zwei Rezeptorsubtypen, AT₁ und AT₂ (Übersicht bei *de Gasparo et al., 2000*). Die bekannten physiologischen Wirkungen werden auf Interaktionen mit dem im adulten Organismus hinsichtlich seiner Expression dominierenden AT₁-Rezeptor zurückgeführt. Unter pathophysiologischen Bedingungen, z.B. nach Myokardinfarkt (*Nio et al., 1995; Zhu et al., 2000a,b*) oder am peripheren Nerven (*Gallinat et al., 1998*) ist eine vorübergehende drastische Überexpression des AT₂-Rezeptors zu beobachten.

Auf periphere Arteriolen wirkt ANG II stark kontrahierend, besitzt darüber hinaus jedoch noch eine Vielzahl weiterer physiologischer Wirkungen. Es stimuliert in der Nebennierenrinde die Aldosteronbiosynthese und -freisetzung, an den Nervenendigungen des sympathischen Nervensystems fördert es die Katecholaminfreisetzung. Auf das zentrale Nervensystem wirkt ANG II unter anderem auch über diejenigen Gehirnbereiche, die sich außerhalb der Blut-Hirn-Schranke befinden. Es stimuliert dort das Bedürfnis zum Trinken und hat natriuretische Effekte, es fördert die Sekretion von Vasopressin und Corticotropin (ACTH) und steigert den Blutdruck. ANG II wird in verschiedenen Geweben auch lokal gebildet und steuert dort lokale Regulationsvorgänge, z.B. im Gehirn, Herzen, Ovar und Hoden (*Campbell, 1987; Danser, 1996; Dzau, 1988a,b; Unger et al., 1988, 1991*).

Das im Blutkreislauf zirkulierende RAS spielt für die Regulation der Natrium-, Volumen- und Herz-Kreislauf-Homöostase eine bedeutende Rolle. Da es sich bei dieser Regulation um ein komplexes System handelt und viele Organe, wie Herz, Gehirn, Nieren, Nebennieren und Blutgefäße, daran beteiligt sind, wird davon ausgegangen, dass ANG II in diesen Organen parakrine, autokrine und intrakrine Funktionen innehat (*Dzau, 1988b*). Eine kritische Diskussion dieser „Gewebe-RAS“ findet sich u.a. bei Unger und Mitarbeitern (*1991*).

Dzau (1988b) beschrieb eine gängige Hypothese von zwei parallel existierenden RAS. Einem zirkulierenden RAS steht danach ein gewebeständiges RAS gegenüber, wobei dem zirkulierenden RAS die Regulation der kurzfristigen kardioresalen Homöostase und dem

gewebeständigen RAS die Modulation des Gefäßtonus, der Gewebefunktion und -struktur, zugeschrieben wurde. Aus dieser Sicht können ANG II-Wirkungen in kurzfristige Effekte, wie etwa der Vasokonstriktion, Erhöhung des Blutdrucks und Aldosteronfreisetzung aus der Nebenniere, und langfristige trophische Effekte, wie etwa die Induktion von Gefäß- und Herzhypertrophie und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen unterschieden werden (*Griffin et al., 1991*).

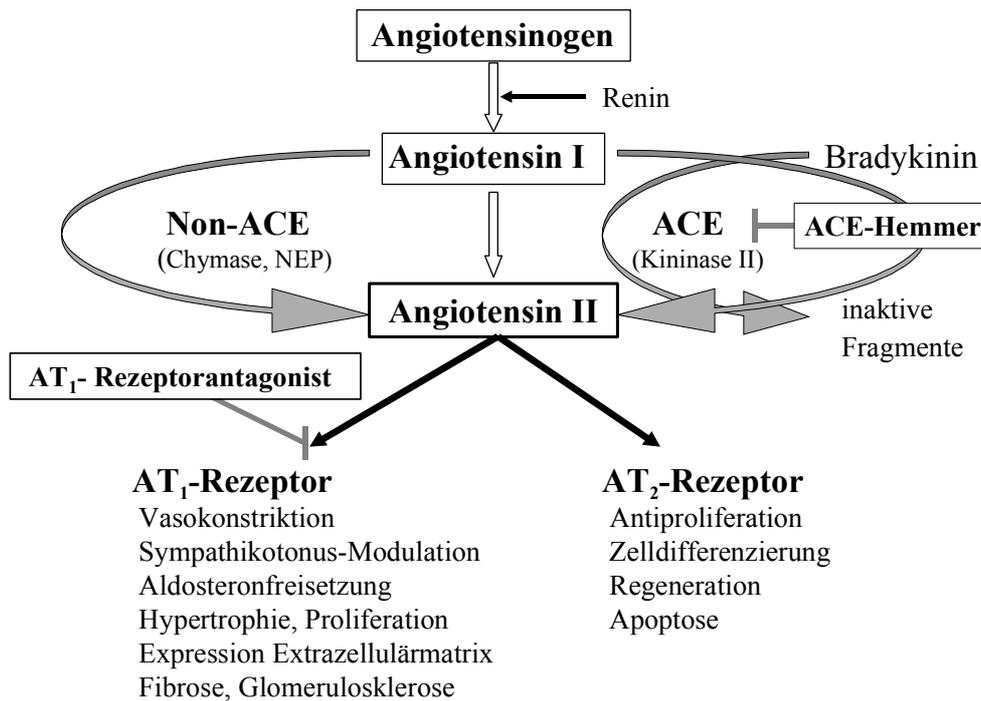


Abbildung 2: Das Renin-Angiotensin-System (Übersicht bei Unger et al., 1996)

1.2.3 Das Renin-Angiotensin-System in Schwann-Zellen

Auch für Schwann-Zellen konnte ein lokales RAS beschrieben werden. Bleuel und Mitarbeiter (1995a) zeigten, dass Schwann-Zellen *in vitro* nicht nur AT₁- und AT₂-Rezeptoren, sondern auch Angiotensinogen und Renin exprimieren. Diese Zellen sind außerdem in der Lage, ANG II in das Kulturmedium zu sezernieren (Bleuel et al., 1995 a, b). Insofern können, da alle wesentliche Komponenten des RAS, inklusive AT₁- und AT₂-Rezeptoren, charakterisiert sind, durch selektive pharmakologische Blockade die ANG II-Wirkungen den jeweiligen Rezeptorsubtypen auch eindeutig zugeordnet werden.

1.2.4 Die Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems

1.2.4.1 Renin

Renin wird in den glomerulusnahen Epithelzellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere gebildet und gespeichert. Die Translation des Renin-Gens ergibt das aus 340 Aminosäuren bestehende Präprorenin, das zu dem enzymatisch inaktiven Prorenin (Molekulargewicht 57 kDa) umgewandelt wird. Das inaktive Prorenin kann chemisch mechanisch (Hsueh et al., 1981; Leckie et al., 1980) oder durch eine Reihe von Enzymen in aktives Renin überführt werden.

Über 80% des insgesamt im Blutkreislauf zirkulierenden Renins kommt als Prorenin vor, wobei von den Nieren 10-mal mehr Prorenin als Renin sezerniert wird, während in extrarenalen Geweben Prorenin lediglich in sehr kleinen Mengen freigesetzt wird.

Ein Überblick über die Kontrollmechanismen der Reninfreisetzung, bei denen intrarenale, sympathische und humorale Mechanismen unterschieden werden, lässt folgende Schlussfolgerung zu (Übersicht bei Hackenthal et al., 1990):

1. Renin wird zum Schutz des Volumens der Extrazellulärflüssigkeit oder des lokalen Blutflusses freigesetzt;
2. Die Reninfreisetzung wird durch Vasokonstriktoren, inklusive ANG II über den AT₁-Rezeptor, und Volumenexpansion der Extrazellulärflüssigkeit gehemmt.

1.2.4.2 Angiotensinogen

Das Plasmaglobulin Angiotensinogen ist das einzig bekannte Substrat für Renin. Es wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert, obwohl sich Angiotensinogen-mRNA und -Protein auch in anderen Organen wie Gehirn, Herz, Niere, Nebenniere, Ovar und Hoden finden lässt. Angiotensinogen wird konstitutiv freigesetzt. Nach bilateraler Nephrektomie, sowie unter dem Einfluß von Glucocortikoiden, Östrogenen, Schilddrüsenhormonen und ANG II

(*Campbell und Habener, 1986; Menard et al., 1983*) wird die Freisetzung von Angiotensinogen gefördert.

1.2.4.3 Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE)

ACE ist diejenige Dipeptidylcarboxypeptidase, welche hauptsächlich für die Umwandlung von Angiotensin I in die aktive Form ANG II verantwortlich ist. ACE ist ein relativ unspezifisches Enzym und kann auch Bradykinin, Enkephaline, Substanz P und das LH(luteinisierendes Hormon)-freisetzende Hormon (LHRH) sowie die β -Kette von Insulin abbauen. Das ACE-Gen konnte bisher aus Lunge und Hoden kloniert und sequenziert werden (*Bernstein et al., 1988; Lattion et al., 1989; Roy et al., 1988*). In einer Studie von 1992 (*Jeunemaitre et al., 1992*) konnte eine Verbindung zwischen einer spezifischen Mutation des ACE-Gens innerhalb eines Untersuchungskollektivs und einem erhöhten Herzinfarkttrisiko beobachtet werden. ACE tritt hauptsächlich im Gefäßendothel auf (*Wilson et al., 1987*). Darüber hinaus wurde ACE auch in den Epithelzellen der Niere, auf dem Bürstensaum der proximalen Tubuli, in der Mitral- und Trikuspidalklappe des Herzens der Ratte, in der Nebennierenrinde und dem Nebennierenmark sowie in verschiedenen anderen Bereichen des Organismus, wie etwa spezifischen Hirnregionen und den Fortpflanzungsorganen, nachgewiesen. Übersichten zu diesem Thema finden sich bei Unger und Mitarbeitern (*1988*) und Erdös (*1990*).

Das in den Hoden vorkommende ACE könnte bei der Regulation der Spermatogenese und der Spermienfunktion eine Rolle spielen, da es in Konzentrationen sowohl in den Ovarialfollikeln als auch in den Spermien und den Keimzellen der Hoden vorkommt. Die Plasma-ACE-Spiegel sind bei Patienten mit Sarkoidose (*Stanislas-Leguern et al., 1986*) erhöht. Durch Glucocortikoid- (*Mendelsohn et al., 1982*) und ACE-Hemmer-Behandlung kann ACE induziert werden (*Fyhrquist et al., 1980; Unger et al., 1981*).

Der wichtigste Stoffwechselweg der ANG II-Bildung wird durch ACE katalysiert. ANG II kann jedoch auch über andere Stoffwechselwege als durch die Umwandlung aus Angiotensin I und von anderen Enzymen als ACE synthetisiert werden. So konnte eine hochspezifische Chymase im menschlichen Herzen identifiziert und charakterisiert werden, die in der Lage ist, ANG II zu synthetisieren (*Urata et al., 1990*). Andere Chymasen von Säugetieren weisen eine weitaus breitere Substratspezifität auf. Eine zweite Klasse von nicht mit Renin in Verbindung stehenden Angiotensinogenasen synthetisiert ANG II direkt aus dem Reninsubstrat Angiotensinogen.

Bei Verabreichung von ACE-Hemmern erhöht sich die Angiotensin(1-7)-Konzentration im Blut auf das Dreifache. Dies zeigt, dass eine Vielzahl von Aminopeptidasen und

Endopeptidasen auf dem Endothel und in den glatten Gefäßmuskelzellen am Metabolismus der Angiotensin-Peptide beteiligt sind (Gohlke et al., 1992).

Das zuvor erwähnte, erst kürzlich entdeckte ACE2 (Crackower et al., 2002; Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000) ist, wie ACE, ebenfalls eine Carboxypeptidase, welche allerdings vom Decapeptid Angiotensin I nur ein einzelnes Peptid carboxyterminal abspaltet, so dass das Nonapeptid Angiotensin 1-9 entsteht. Dessen biologische Bedeutung ist im einzelnen zwar noch nicht geklärt, aber es ist bekannt, dass es durch ACE wiederum zu dem Vasodilatator Angiotensin 1-7 umgewandelt werden kann.

1.2.4.4 Angiotensin II

ANG II stellt das wichtigste Effektorpeptid des RAS dar. Es handelt sich dabei um ein Oktapeptid, das aus ANG I, einem Dekapeptid, durch Abspaltung zweier Aminosäuren am C-terminalen Ende mit Hilfe des ACE, das ubiquitär am Endothel lokalisiert ist, entsteht. Das weit gestreute Spektrum der Zielgewebe von ANG II umfasst Nieren, Nebennieren, Gehirn, Hypophyse, glatte Gefäßmuskelzellen und das sympathische Nervensystem (Übersicht bei *de Gasparo et al., 2000*). ANG II entfaltet seine spezifischen Wirkungen über spezifische Rezeptoren. Alle bislang beschriebenen „klassischen“ Wirkungen des Hormons werden über seine AT₁-Rezeptoren vermittelt. Es verursacht nicht nur eine arterielle Vasokonstriktion, sondern regt auch das Zellwachstum einer Vielzahl von Zellen an, z.B. der glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Kardiomyozyten und renalen Mesangiumzellen (*Stoll et al., 1995a; Wolf et al., 1992*, Übersicht bei *de Gasparo et al., 2000*) (*Abbildung 2*). Für weitere Angiotensinfragmente wie das mit Hilfe verschiedener Aminopeptidasen synthetisierte Angiotensin III (ANG 2-8), Angiotensin IV (ANG 3-8) und ANG (1-7) konnten ebenfalls biologische Wirkungen nachgewiesen werden. Die Degradierung dieser biologisch aktiven Substanzen durch Angiotensinasen führt schließlich zu inaktiven Metaboliten (Übersicht bei *Timmermans et al., 1993*)

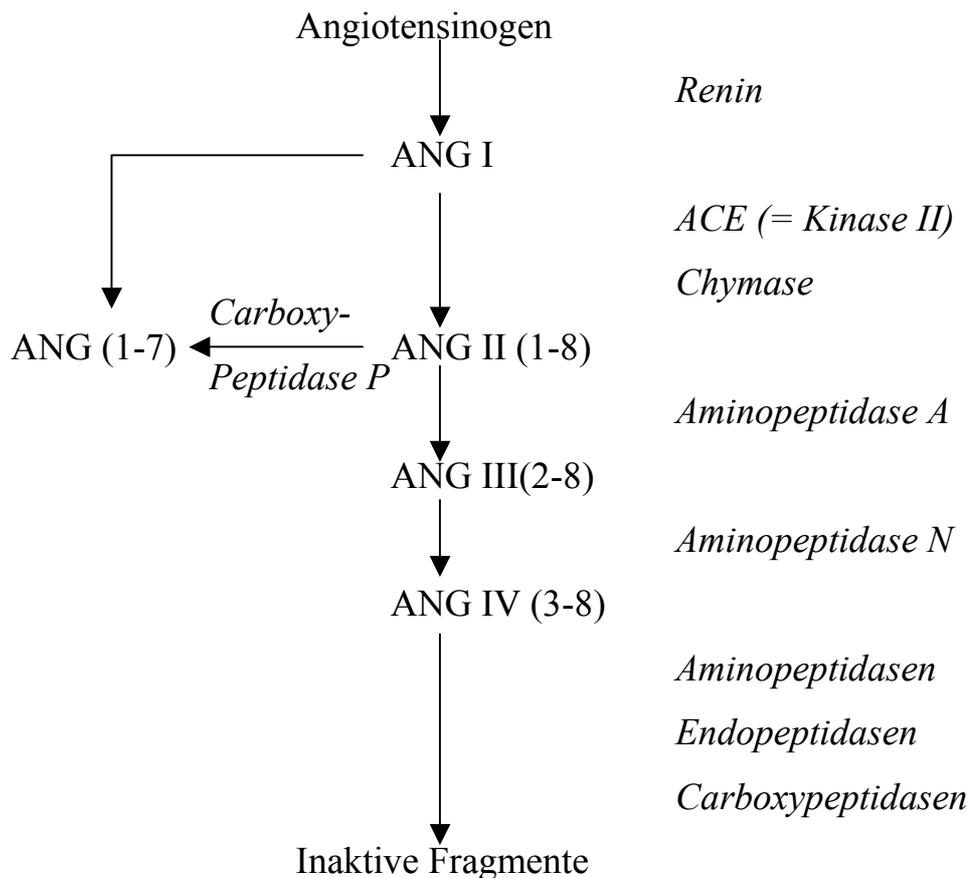


Abbildung 3: *Enzymatische Synthese und Degradierung von ANG II*

1.2.4.5 ANG II-Rezeptoren

Anhand von neu entwickelten peptidischen und nicht-peptidischen Rezeptor-Antagonisten konnten zwei verschiedene Rezeptorsubtypen charakterisiert werden. Der gegenwärtigen Nomenklatur zufolge werden sie als AT₁- und AT₂-Rezeptor bezeichnet.

Angiotensin-Rezeptorsubtypen wurden in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen (Obermüller et al., 1991; Saveedra, 1992; Steckelings et al., 1992; Stoll et al., 1995a), dabei sind AT₁- und AT₂-Rezeptoren im Gewebe unterschiedlich verteilt. Während beide Rezeptorsubtypen in Nebenniere, Herz, Endothelzellen, Nierenarterien und Uterus adulter Organismen vorkommen (Chappell et al., 1992; Simon et al., 1991; Stoll et al., 1995b), herrscht der AT₂-Rezeptor in der Bauchspeicheldrüse, im Nebennierenmark, im Uterus und in den Granulosazellen der Eierstöcke vor. Der AT₂-Rezeptor ist ferner weit verbreitet im fetalen Gewebe (Grady et al., 1991; Tsutsumi et al., 1991a); weshalb ihm eine Beteiligung an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen zugeschrieben wird. Schon kurz nach der Geburt finden in den meisten Gewebearten jedoch bedeutende Veränderungen im Verhältnis

von AT₁- und AT₂-Rezeptoren statt, und im adulten Organismus von Säugern dominiert der AT₁-Rezeptor in vielen Organen (*Tsutsumi und Saveedra, 1991b; Viswanathan et al., 1991*). Unter pathophysiologischen Bedingungen und gewebsregenerativen Prozessen wie der Wundheilung (*Kimura et al., 1992*), der Neointimabildung nach Gefäßverletzung und dem „Remodelling“ nach Myokardinfarkt (*Nio et al., 1995, Zhu et al., 2000a,b*) wird eine vorübergehend drastisch veränderte Expression des AT₂-Rezeptors beobachtet.

1.2.4.5.1 Der AT₁-Rezeptor

Die meisten der heute bekannten physiologischen Effekte von ANG II (z.B. Blutdruckkontrolle, Aldosteronfreisetzung, Osmoregulation etc.) werden über den AT₁-Rezeptor vermittelt. Hinsichtlich der pathophysiologisch ebenfalls bedeutsamen Osmoregulation und Volumen-Homöostase muß hierbei ergänzend gesagt werden, dass auch den AT₂-Rezeptoren hierbei wichtige, teilweise AT₁-antagonisierende Effekte zukommen könnten (Übersicht bei *Culman et al., 1998*).

Die AT₁-Rezeptoren sind im adulten Organismus in peripheren Geweben wie den Blutgefäßen, dem Herzen, der Niere und der Nebenniere, aber auch im Gehirn in hoher Zahl exprimiert und zeigen eine hohe Affinität für Sartane, wie z.B. Losartan, Candesartan, Telmisartan, Eprosartan und Valsartan ($K_i = 10\text{-}50\text{ nM}$), und dagegen geringe Affinität für CGP 42112A ($K_i > 0,5\text{ M}$) und PD 123177 ($K_i > 10\text{ M}$) (*Bumpus et al., 1991*).

Auf Protein- und Nukleinsäureebene bestehen große Homologien zwischen den jeweiligen AT₁-Rezeptoren von Mensch, Ratte und Maus, aber auch zwischen den AT₁-Rezeptor-Isoformen, AT_{1a} und AT_{1b} (*Kakar et al., 1992; Sandberg et al., 1992; Sasamura et al., 1992*), die bei Ratte und Maus nachgewiesen wurden.

AT₁-Rezeptoren gehören der Familie der G-Protein-gekoppelten Sieben-Transmembran-Rezeptoren an. Nach Bindung von ANG II werden beide Rezeptor-Isoformen schnell über Endosomen internalisiert und gelangen nach Dissoziation des Liganden dann zum Teil wieder an die Plasmamembran (*Hein et al., 1997*).

Der AT₁-Rezeptor scheint auch bei der Regulation von Zellwachstum und Proliferation in bestimmten Zellpopulationen eine entscheidende Rolle zu spielen. Seine Stimulation bewirkt eine Induktion von Proteinsynthese, Zellproliferation und/oder Hypertrophie in unterschiedlichen Zelltypen, wie z.B. glatten Gefäßmuskelzellen, vaskulären Endothelzellen, Fibroblasten und Myozyten (*Baker und Aceto, 1990; Schelling et al., 1991; Stoll et al., 1995 a,b*), was sich auch in der veränderten Aktivität induzierbarer Transkriptionsfaktoren und der vermehrten Expression nachgeschalteter wachstumsassoziierter Gene widerspiegelt (Übersicht bei *Lucius et al., 1999*). In verschiedenen Zellpopulationen konnten jeweils anti-

apoptotische (Pollman et al., 1996) aber auch apoptotische Effekte (Leri et al., 2000) des AT₁-Rezeptors nachgewiesen werden. Eine Reihe von Studien hat in diesem Zusammenhang die Bedeutung der chronischen AT₁-Rezeptor-Überstimulation für die Pathogenese der arteriellen Hypertonie und ihrer Folgeerkrankungen, wie z.B. der Nephrosklerose und der vaskulären Mediahypertrophie, zeigen können (Übersicht bei Unger et al., 1999). Ebenso kann durch pharmakologische Blockade der AT₁-Rezeptoren der pathologische Umbau der Textur des Herzmuskels nach einem Myokardinfarkt entscheidend verringert werden (Schieffer et al., 1994; van Kats et al., 2000).

1.2.4.5.2 Der AT₂-Rezeptor

Über die physiologische Funktion des AT₂-Rezeptors ist bis zum heutigen Zeitpunkt weit weniger bekannt. Mit Hilfe selektiver Rezeptorliganden gelingt in zunehmendem Maße auch die weitere funktionelle Charakterisierung dieses Angiotensin-Rezeptor-Subtyps. Die AT₂-Rezeptor-Gene von Mensch, Ratte und Maus wurden kloniert und weisen auf Nukleinsäure- und Proteinebene untereinander eine Homologie von ca. 90% auf (Martin et al., 1994; Mukoyama et al., 1993; Nakajima et al., 1993; Tsuzuki et al., 1994). Obwohl ANG II mit ähnlicher Affinität sowohl an AT₁- als auch an AT₂-Rezeptoren bindet, unterscheiden sich diese Rezeptorsubtypen hinsichtlich ihrer Gensequenzen (Homologie ca. 34%) erheblich. Das Gen des humanen AT₂-Rezeptors ist auf dem x-Chromosom lokalisiert, so dass über die Beteiligung von Mutationen des Genes bei x-chromosomal gebundenen Erbgängen spekuliert wird. (Schmieder et al., 2001). Es besteht aus 3 Exons, wobei sich die kodierende Sequenz vollständig auf dem letzten Exon befindet (Elton et al., 1995).

Der AT₂-Rezeptor besitzt eine hohe Affinität für CGP 42112A ($K_i < 1 \text{ nM}$) und PD 123177 ($K_i = 10\text{-}100 \text{ nM}$), jedoch nur eine geringe Affinität für Sartane ($K_i > 1 \text{ mM}$) (Bumpus et al., 1991).

Signaltransduktion des AT₂-Rezeptors

Wie der AT₁-Rezeptor gehört auch der AT₂-Rezeptor zur Familie der Sieben-Transmembran-Rezeptoren (Kambayashi et al., 1993; Mukoyama et al., 1993). Allerdings sind seine mögliche, noch nicht vollständig gesicherte Kopplung an G-Proteine sowie die weitere Signaltransduktion bislang nur unvollständig aufgeklärt (Übersicht bei de Gasparo et al., 2000; Kaschina und Unger, 2003; Nahmias und Strosberg, 1995b; Unger, 1999). Sowohl an PC12W (Phäochromozytom-Zelllinie)- und COS7-Zellen, einer den AT₂-Rezeptor stabil exprimierenden Zelllinie, als auch an neuronalen Primärkulturen konnte gezeigt werden, dass eine Kopplung an eine Untergruppe von inhibitorischen G-Proteinen erfolgt (Kambayashi et

al., 1993; Kang *et al.*, 1993; Takahasi *et al.*, 1994; Zhang und Pratt, 1996). Die Tatsache, dass weitere Studien eine Insensitivität gegenüber Pertussistoxin, einem Hemmstoff inhibitorischer G-Proteine, zeigten (Bottari *et al.*, 1991; Buisson *et al.*, 1995; Mukoyama *et al.*, 1993; Pucell *et al.*, 1991), weist auf ein mögliches atypisches inhibitorisches G-Protein als Kopplungsmolekül (Buisson *et al.*, 1995) hin. Bindungsstudien ergaben, dass auch die Art der molekularen Interaktion von Rezeptor und G-Protein sich von der klassischen Assoziation unterscheidet. So ist nur unvollständig geklärt, welcher der nachfolgend beschriebenen Signaltransduktionswege des AT₂-Rezeptors G-Protein vermittelt bzw. G-Protein unabhängig ist (Übersicht bei Rosenstiel *et al.*, 2002).

AT₂-Rezeptoren vermitteln antiproliferative Wirkungen in verschiedenen Zelltypen. So konnte zuerst von Stoll und Mitarbeiter (1995a) an koronaren Endothelzellen gezeigt werden, dass eine AT₂-Rezeptor-Stimulation die AT₁-Rezeptor- und die über Wachstumsfaktoren-vermittelten Wachstumseffekte antagonisiert. Auf der Signaltransduktionsebene sind mittlerweile verschiedene Wege bekannt, die für diese Effekte verantwortlich gemacht werden können. Stimulation des AT₂-Rezeptors vermindert über die MAK-Kinase-Phosphatase-1 (MKP-1) die MAP-Kinase-Aktivität und aktiviert die lösliche Phosphotyrosinphosphatase SHP-1, die ebenfalls mit Wachstumskontrolle in Verbindung gebracht wird (Bedecs *et al.*, 1997; Horiuchi *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 1996).

Als extremste Form der Hemmung des Wachstums ist gezeigt worden, dass AT₂-Rezeptoren auch an der Auslösung von apoptotischen Prozessen beteiligt sein können. Gallinat und Mitarbeiter (1999) konnten in PC12W-Zellen unter bestimmten Bedingungen zeigen, dass eine AT₂-Rezeptorstimulation einen Anstieg der intrazellulären Ceramidkonzentration hervorruft, einem Lipidbotenstoff der programmierten Zelltod induzieren kann. In weiteren Studien wurde beobachtet, dass offenbar der zelluläre Funktionszustand eine Rolle für die Sensitivität der Zellen gegenüber dem apoptotischen Stimulus über AT₂-Rezeptoren spielt. So konnte in postnatalen Nervenzellen der Ratte durch die Rezeptorstimulation alleine kein Zelltod ausgelöst werden, nach UV-Bestrahlung hingegen wurde die Apoptoserate verstärkt (Shenoy *et al.*, 1999).

Andererseits wurde für den AT₂-Rezeptor auch eine gegensinnige Wirkung auf wichtige Signaltransduktionswege von Wachstum und Überleben gezeigt. In proximalen Tubuluszellen der Kaninchenniere stimuliert der AT₂-Rezeptor über Arachidonsäurefreisetzung die Aktivität der löslichen G-Proteins p21 ras (Homolog eines Onkogens des Sarkomvirus der Ratte, rat sarcoma virus oncogene homolog), welches wiederum über die MAP-Kinasen einen fördernden Einfluß auf Zellwachstum und Proliferation hat (Jiao *et al.*, 1998). In

Neuroblastomzellen (NG108-15) konnte hingegen beobachtet werden, dass AT₂-Rezeptorstimulation zwar die MAP-Kinase-Aktivität und das damit verbundene Zellwachstum fördert, aber dieser Effekt auch eine Inhibierung von p21 ras beinhaltet (*Gendron et al., 1999*). Offenbar sind auch hier die Umgebungsbedingungen und der Funktionszustand der jeweiligen Zellen von entscheidender Bedeutung. Dieses Konzept unterstreicht auch die Studie von Stroth und Mitarbeitern (2000), in der nur in ruhenden PC12W-Zellen über den AT₂-Rezeptor MAP-Kinase-Aktivität stimuliert, in NGF-stimulierten Zellen jedoch reprimiert wird.

An kultivierten neuronalen Zellen des Hypothalamus verstärkte ANG II über AT₂-Rezeptoren die auswärts gerichteten K⁺-Ionenströme, während es über AT₁-Rezeptoren diese verminderte (*Kang et al., 1992*). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ANG II die Dauer und Frequenz von Aktionspotentialen zu modulieren vermag. In diesen Zellen, in denen nach einer AT₂-Rezeptor-Stimulation eine Verringerung der cGMP-Spiegel beobachtet wurde (*Sumner et al., 1991*), erfolgt nach einer derartigen Stimulation sowohl die Aktivierung der Serin/Threonin-Phosphatase 2A (PP2A) (*Kang et al., 1993, 1995*) als auch die Aktivierung der Phospholipase A₂ (*Zhu et al., 1998*).

Beteiligung des AT₂-Rezeptors an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen

Erste indirekte Hinweise auf eine Beteiligung von AT₂-Rezeptoren an Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen ergaben frühe Untersuchungen, die sich mit der zeitlichen Expression und Gewebeverteilung dieser Rezeptoren beschäftigten. Dabei wurde festgestellt, dass AT₂-Rezeptoren in fetalen Geweben einschließlich des Gehirns stark exprimiert werden (*Gehlert et al., 1991; Millan et al., 1991*). Postnatal ändert sich das Verhältnis von AT₂- zu AT₁-Rezeptoren jedoch dramatisch (1.2.4.5 ANG II-Rezeptoren).

Die AT₂-Rezeptor-Expression folgt einem strengen zeitlichen Muster, das an verschiedene Differenzierungsstadien gekoppelt ist. In der Aorta fetaler Ratten ist der Beginn der Zelldifferenzierung mit einer Hemmung der DNA-Synthese und mit einer gleichzeitig erhöhten Expression von AT₂-Rezeptoren verbunden (*Pratt, 1996*). Ferner wurde beschrieben, dass im Verlauf der Ontogenese die AT₂-Rezeptor-Expression in der Haut zum Zeitpunkt der intermediären Differenzierung erfolgt, also zwischen dem Ende Morphogenese und der Beendigung der funktionalen Differenzierung (*Gasc et al., 1996*).

AT₂-Rezeptoren werden in neuronalen Zellen exprimiert. In NG108-15-Zellen, einer Neuroblastoma-Glioma-Zelllinie, verminderten AT₂-Rezeptoren die Permeabilität von T-Typ Calcium-Kanälen (*Buisson et al., 1992; 1995*). Aufgrund der Rolle dieser Kanäle bei der

neuronalen Differenzierung und aufgrund des Expressionsmusters der AT₂-Rezeptoren mit ihrer starken, transienten Expression während der Embryonalentwicklung wurde daher eine Beteiligung dieser Rezeptoren an Zelldifferenzierungs- und Entwicklungsprozessen postuliert. Eine Grundvoraussetzung für eine Beteiligung an Differenzierungsprozessen ist durch die wachstumshemmenden Effekte gegeben, die durch AT₂-Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen vermittelt werden (*Unger et al., 1996*). Weiterhin konnte sowohl an PC12W-Zellen (*Meffert et al., 1996*) als auch an NG108-15-Zellen (*Laflamme et al., 1996*) gezeigt werden, dass eine AT₂-Rezeptor-Stimulation das Auswachsen von Neuriten nicht nur zu induzieren vermag, sondern auch die NGF-vermittelte morphologische Differenzierung verstärkt.

Durch diese Untersuchungen konnte erstmals der direkte Nachweis dafür erbracht werden, dass AT₂-Rezeptoren an Differenzierungsvorgängen neuronaler Zellen beteiligt sind.

Pathophysiologische und regenerative Prozesse des AT₂-Rezeptors

Die wachstumsinhibierenden Eigenschaften der AT₂-Rezeptoren scheinen bei pathophysiologischen und regenerativen Vorgängen eine große Bedeutung zu haben. So ist die Expression von AT₁- und AT₂-Rezeptoren z.B. im Herzen nach Myokardinfarkt erhöht (*Nio et al., 1995; Zhu et al., 2000a,b*). Eine Erhöhung der Rezeptor-Expression konnte auch bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz (*Lopez et al., 1994*) und nach Verletzung der Haut bzw. Gehirnläsion (*Regitz-Zagrosek et al., 1995; Tsutsumi und Saveedra, 1992*) beobachtet werden.

Eine Beteiligung des AT₂-Rezeptors an apoptotischen Prozessen konnten Studien an PC12W-Zellen (*Gallinat et al., 1999; Lehtonen et al., 1999 a,b; Yamada et al., 1996*), Hautfibroblasten von Mäuseembryonen (*Li et al., 1998*), Granulosazellen im Ovar (*Pucell et al., 1991; Tanaka et al., 1995*) und in der fetalen Niere (*Kakuchi et al., 1995*) zeigen. Es sollte jedoch festgehalten werden, dass die pro-apoptische Gestalt des AT₂-Rezeptors nur unter spezifischen experimentellen Bedingungen enthüllt werden kann, wie z.B. nach Serumentzug/NGF-Abhängigkeit, was normalerweise die Basis für Apoptose schafft (*de Gasparo et al., 2000*).

Der Mechanismus hinter der AT₂-Rezeptor-vermittelten Apoptose scheint komplex zu sein, da möglicherweise beide AT₁- und AT₂-Rezeptor in diesem Prozess involviert sind (*de Gasparo und Siragy, 1999*).

Das im Ovar und Uterus vorhandene lokale RAS (*Bumpus et al., 1988*) beeinflusst Vorgänge wie Ovulation und Steroidgenese (*Feral et al., 1995; Kuo et al., 1991; Pucell et al., 1987*). Den hauptsächlich von Granulosazellen *in vitro* und *in vivo* exprimierten AT₂-Rezeptoren

(Pucell et al., 1991; Yoshimura et al., 1996) wird eine wichtige Funktion u.a. bei der Oocytenreifung, der Ovulation und der Produktion von Estradiol und Prostaglandinen (Yoshimura et al., 1996) zugeschrieben.

Diese Studien zeigen, dass AT₂-Rezeptoren nicht nur an pathologischen Vorgängen, sondern auch an physiologischen Umbauprozessen beteiligt sind, wie sie z.B. regelmäßig im weiblichen Reproduktionssystem stattfinden.

Weiterhin konnte eine Beteiligung des AT₂-Rezeptors an neuroregenerativen Prozessen gezeigt werden. So exprimieren kultivierte Schwann-Zellen beide AT₁- und AT₂-Rezeptoren. ANG II vermindert die Expression der Neuriten-fördernden Protease Nexin-1. Blockade von AT₁- und AT₂-Rezeptor führt zu einem mehrfachen Anstieg von Nexin-1, das die Nervenregeneration begünstigt (Bleuel et al., 1995a).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine deutliche AT₂-Rezeptor-mRNA-Hochregulation in regenerierenden Neuronen nach Quetschläsion des N. ischiadicus, als eine von proximal nach distal verlaufende AT₂-Expressions-Welle, mit der Regeneration von Nervenfasern zusammenfällt (Gallinat et al., 1998). Weiterhin vermag ANG II sowohl die axonale Ausdehnung postnataler Retinaexplantate und dorsaler Spinalganglien-Neurone, als auch die axonale Regeneration retinaler Ganglienzellen nach Quetschung des N. opticus der adulten Ratte zu fördern (Lucius et al., 1998).

1.2.5 Der AT₁-Rezeptor-Rezeptor-Antagonist Losartan

Nachdem 1971 mit Saralasin (Pals et al., 1971) der erste, allerdings unselektive ANG II-Rezeptor Antagonist eingeführt worden war, folgte mit Losartan der erste, sehr spezifische und hochselektive, hochaffine, nicht-peptidische AT₁-Rezeptor-Antagonist (Chiu et al., 1990).

Losartan, ein Imidazol-Biphenyl-Tetrazolderivat, war weltweit der erste synthetische AT₁-Rezeptor-Antagonist, der therapeutisch für die Behandlung der essentiellen Hypertonie und chronischer Herzinsuffizienz zugelassen wurde.

Losartan hat eine nur 10fach schwächere Affinität zum AT₁-Rezeptor als der physiologische AT₁-Agonist ANG II und andere AT₁-Rezeptor-Antagonisten. Außerdem ist seine Halbwertszeit und damit Wirkdauer relativ kurz. Es wird aber bei der First-pass-Metabolisierung zu einem weiteren aktiven Metaboliten, EXP3174, abgebaut, der eine Imidazol-Carbonsäurestruktur aufweist und dem wir hauptsächlich die therapeutische Wirkung verdanken. Losartan bindet mit ausreichend hoher Affinität an den AT₁-Rezeptor, seine IC₅₀ beträgt 19 nM. EXP3174 hat eine den anderen AT₁-Rezeptor-Antagonisten vergleichbare Affinität, seine IC₅₀ ist 3,7 nM (Siegl, 1993). Die AT₁-Rezeptorselektivität von

Losartan ist 30000 und damit im Vergleich zum AT₂-Rezeptor sehr hoch. Übersichtsarbeiten über die Pharmakokinetik von Losartan und am AT₁-Rezeptor finden sich bei Timmermans et al. (1993).

1.2.6 Der AT₂-Rezeptor-Antagonist PD 123319

PD 123319 ist ein nicht-peptidischer AT₂-Rezeptor-Antagonist, der von der Firma Parke-Davis entwickelt wurde. Sein chemischer Name lautet 1-[[4-(Dimethylamino)-3-methylphenyl]methyl]-5-(diphenylacetyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-imidazo[4,5-c]pyridine-6-carboxylsäure. Diese Substanz bindet mit hoher Affinität an den AT₂-Rezeptor. Seine IC₅₀, bestimmt im Kaninchenuterus, beträgt 8,3 nM, während für seine Affinität, unselektiv am AT₁-Rezeptor zu binden, bestimmt in der Rattenleber, bei einer Konzentration von 10⁻⁵M nur 10-15 % angegeben wird (*PD 123319 Fact Sheet; Parke Davis*). Noch besitzt dieser Stoff keine therapeutische Relevanz, sondern wird ausschließlich zu Forschungszwecken eingesetzt.

1.3 Pathophysiologie von AT₁- und AT₂-Rezeptoren im Nervensystem

Da für die Interpretation der dieser Arbeit zugrunde liegenden Ergebnisse die genaue Kenntnis der komplexen Pathophysiologie des RAS am Nerven wichtig ist, soll diesbezüglich an dieser Stelle eine ausführlichere Darstellung der bisher bekannten Funktionen der AT₁- und AT₂-Rezeptoren erfolgen. Besondere Berücksichtigung finden hierbei neuronale Entwicklung, Regeneration und zellspezifische Expression.

1.3.1 Funktion des AT₁-Rezeptors am Nerven

Im Gegensatz zu AT₂-Rezeptoren, die antiproliferative Effekte vermitteln (*Ichiki et al., 1995; Meffert et al., 1996; Munzenmaier und Greene, 1996; Nahmias et al., 1995a,b; Nakajima et al., 1995; Stoll et al., 1995a*) und die Zelldifferenzierung neuronaler Zellen fördern (*Gallinat et al., 1997, 1998; Laflamme et al., 1996; Meffert et al., 1996; Stroth et al., 1998*) sowie Einfluss auf neuroregenerative wie apoptotische Prozesse haben, löst eine AT₁-Rezeptor-Stimulation die meisten der bekannten physiologischen ANG II-Wirkungen aus, zu denen auch die Induktion des Zellwachstums gehört (*Blume et al., 2000*).

Die AT₁-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionswege in Neuronen sind vergleichbar mit denen, die in anderen ANG II-Zielgeweben beobachtet wurden. Zusätzlich zur Phosphoinositolhydrolyse mit Inositoltriphosphat- und Diacylglycerol-Bildung sowie der Erhöhung des intrazellulären Calciumflusses [Ca²⁺]_i und der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), wird durch ANG II die ras/raf/MAPK-Kaskade und die Translokation von Mitogen-

aktivierter Proteinkinase (MAPK) in den Nucleus stimuliert (Lu *et al.*, 1996). ANG II führt außerdem zu einer erhöhten Expression von c-fos, c-jun und weiteren „early response“-Genen. Der MAPK-Weg führt zur ANG II-stimulierten Noradrenalin-Synthese und -Wiederaufnahme-Mechanismen innerhalb kultivierter Neurone (Yang *et al.*, 1996). Zusätzlich aktiviert eine ANG II-induzierte Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ die Calcium/Calmodulin-Proteinkinase II, welche zusammen mit der PKC die schnellen Aktionen von ANG II auf neuronale Membranströme vermittelt. Diese umfassen eine PKC-vermittelte Erhöhung des gesamten neuronalen Ca^{2+} -Stromes (I_{Ca}) ebenso wie die PKC- und Calcium/Calmodulin Proteinkinase II-vermittelte Inhibition des verzögerten gleichgerichteten K^+ -Ionenstromes (K_V) und des kurzfristigen K^+ -Ionenstromes (I_A) (Zhu *et al.*, 1997, 1998). An supraoptischen Neuronen der Ratte konnte gezeigt werden, dass AT_1 -Rezeptoren die ANG II-induzierte Aktivierung von nicht-selektiven Na^+/Ca^{2+} -Kanälen, welche die neuronale Depolarisation fördern, vermitteln (Yang *et al.*, 1992).

Einige der hier beschriebenen, AT_1 -Rezeptor-vermittelten aktivierenden Effekte auf Neuronen, einschließlich der MAPK-Aktivierung, stehen unter der inhibitorischen Kontrolle des AT_2 -Rezeptors. Diese Kontrolle verläuft über die AT_2 -Rezeptor-vermittelte Aktivierung von Serin/Threonin Typ 2A (PP-2A)- (Huang *et al.*, 1996) sowie möglicherweise Tyrosin Phosphatasen, solchen wie der MAPK-Phosphatase.

Für kultivierte Schwann-Zellen konnte, gezeigt werden, dass hier der AT_1 - ebenso wie der AT_2 -Rezeptor an der Modulation der proteolytischen Aktivität des extrazellulären Milieus durch Regulation der Protease Nexin-1 beteiligt ist. Da bei intakten Nervenfasern keine Schwann-Zell-Proliferation stattfindet und sie bereits vollständig differenziert vorliegen, werden erst nach Zellschädigung bzw. unter dann folgender Proliferation eine vermehrte Expression von AT_1 -Rezeptoren beobachtet. Die konnte in mehreren Studien gezeigt werden (Bleuel *et al.*, 1995 a, b; Gallinat *et al.*, 1998).

1.3.2 AT_2 -Rezeptoren und neuronale Entwicklung

Während der AT_1 -Rezeptor die Zellproliferation stimuliert, hemmt der AT_2 -Rezeptor sowohl das Zellwachstum als auch die Proliferation und fördert die Zelldifferenzierung (Übersicht bei de Gasparo *et al.*, 2000; Unger, 1999). Gegensätzliche Effekte von AT_1 - und AT_2 -Rezeptoren in Bezug auf Zellproliferation wurde bei koronaren Endothelzellen beobachtet (Stoll *et al.*, 1995a), bei denen das AT_1 -Rezeptor-vermittelte Zellwachstum durch AT_2 -Rezeptoren antagonisiert wurde. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Nakajima und Mitarbeitern (1995) erhalten, die nach einem *in vivo* AT_2 -Rezeptor-Gentransfer in die ballonkatheterverletzte

Arteria carotis feststellt, dass die AT₂-Rezeptor-Expression proliferationshemmende Wirkungen vermittelt.

Eine AT₂-Rezeptor-induzierte wachstumshemmende Wirkung wurde an verschiedenen Zelltypen untersucht, z.B. neuronalen NG 108-15-Zellen (*Laflamme et al., 1996*), PC12W-Zellen (*Meffert et al., 1996*) und R3T3-Zellen (*Tsuzuki et al., 1996*) sowie renalen Mesangiumzellen (*Goto et al., 1997*) und ebenso in *in vivo*-Experimenten, die ein mikrovaskuläres Wachstum untersuchten (*Munzenmaier et al., 1996*). Der exakte Mechanismus des AT₂-Rezeptor-vermittelten Wachstumsstopps ist bislang noch ungeklärt.

Neuronale Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose werden durch verschiedene neurotrophe Faktoren kontrolliert. Beispielsweise differenzieren PC12W-Zellen, welche ein etabliertes Modell für neuronale Differenzierungs- und Apoptosestudien darstellen, zu sympathischen Neuron-ähnlichen Zellen als Reaktion auf eine NGF-Behandlung (*Greene and Tischler, 1982*). Nach Entzug des Wachstumsfaktors wird ein apoptotisches Programm aktiviert (*Mesner et al., 1995*).

AT₂-Rezeptoren sind nicht nur an der Einleitung der Zelldifferenzierung durch Zellshift in den Zellzyklusarrest beteiligt, sondern vermitteln zudem Neuritenextension wie z.B. in PC12W-Zellen gezeigt (*Meffert et al., 1996*). Durch ANG II-Behandlung lässt sich ein Neuritenauswachsen induzieren sowie eine deutliche Zunahme NGF-vermittelter morphologischer Veränderungen erzielen. Beide Effekte werden vollständig durch Co-Inkubation mit dem spezifischen AT₂-Rezeptor-Antagonisten PD 123319 unterdrückt. Durch diese Versuche konnte erstmalig der direkt Nachweis dafür erbracht werden, dass der AT₂-Rezeptor an neuronalen Differenzierungsvorgängen beteiligt ist. Eine vergleichbare AT₂-Rezeptor-vermittelte Neuritenausdehnung konnte in NG108-15-Zellen, einer Neuroblastoma/Glioma-Zelllinie, beobachtet werden (*Laflamme et al., 1996*). Es konnte ebenso infolge einer ANG II-Behandlung ein AT₂-Rezeptor-vermitteltes Neuritenauswachsen in Neuronen, die aus postnatalen Spinalganglien (Lucius und Mitarbeiter, nicht veröffentlichte Daten) gewonnen wurden, als auch in postnatalen Retina-Explantaten (*Lucius et al., 1998*) detektiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass AT₂-Rezeptoren nicht nur für die Differenzierung erforderlich sind, indem sie antiproliferative Effekte ausüben, sondern auch aktiv an der neuronalen Differenzierung beteiligt zu sein scheinen, wie dem Neuritenwachstum.

Die neuronale Differenzierung zeigt bedeutungsvolle Veränderungen innerhalb der Gen- und Proteinexpression. Dabei ist die neuronale Stabilität und Funktion von Proteinfilamenten, die das Zytoskelett bilden, abhängig. Zum Zytoskelett gehören 3 unterschiedliche

Filamentsysteme: Das Aktin-Myosin-System, die Mikrotubuli und die Intermediärfilamente. In Nervenzellen bilden die Mikrotubuli zusammen mit den Intermediärfilamenten das Zytoskelett der Axone und Dendriten aus. Dort sind sie neben ihrer Stützfunktion auch für den axonalen Transport zuständig (*Vale, 1987*). Änderungen im Expressionsverhalten werden z. B. durch NGF-Behandlung von PC12W-Zellen darstellbar.

Die Neurofilament (NF) Triplet Proteine gehören zu einer Intermediärfilamentprotein-Klasse, die ausschließlich in Neuronen exprimiert wird. Diese sind in der frühen Phase der Embryogenese detektierbar (*Cochard und Paulin, 1984; Tapscott et al., 1981*). Es existieren drei Untereinheiten der NFs mit einer molekularen Masse von 68 kDa (NF-L), 160 kDa (NF-M) und 200 kDa (NF-H). Dieser Intermediärprotein-Typ ist nicht nur für die Stabilität von Neuronen verantwortlich, sondern auch an deren axonalem Wachstum in Folge der Elongationsphase beteiligt (*Hoffman et al., 1987; Sakaguchi et al., 1993*), was zur erhöhten Leitungsgeschwindigkeit führt (*Sakaguchi et al., 1993*).

Zur weiteren Charakterisierung AT₂-Rezeptor-induzierter morphologischer Veränderungen in PC12W-Zellen wurden die AT₂-Rezeptor-vermittelten Effekte auf das Expressionsmuster von NF untersucht. Im Gegensatz zur NGF-Stimulation (*Lee et al., 1982; Lindenbaum et al., 1988*) sind die morphologischen Veränderungen nach AT₂-Rezeptor-Aktivierung von einer AT₂-Rezeptor-vermittelten NF-M-Herabregulierung begleitet (*Gallinat et al., 1997*). Es konnte außerdem demonstriert werden, dass AT₂-Rezeptoren die Expression von „microtubule-associated protein 1B“ (MAP1B), MAP2 und β -Tubulin in PC12W-Zellen modulieren (*Stroth et al., 1997*). Während die MAP1B-Expression abgeschwächt wird, führt die AT₂-Rezeptor-Stimulation zur β -Tubulin- und MAP2 -Hochregulation.

Laflamme und Mitarbeiter konnten diese Ergebnisse bestätigen, indem sie zeigten, dass auch das AT₂-Rezeptor-induzierte Neuritenauswachsen in NG108-15-Zellen von einer β -Tubulin-, tau-, einem Mikrotubuli-assoziierten Protein, und MAP2C-Regulation begleitet wurde (*Laflamme et al., 1996*). Diese Tatsache legt eine mögliche Rolle der AT₂-Rezeptoren innerhalb der Proteinfilamentenregulation in neuronalen Zellen nahe.

Auch morphologische Differenzierungsstudien an zerebralen Zellen zeigten eine verstärkte Neuritenausdehnung, Zellmigration und Expressionerhöhung von Neuronen-spezifischem beta-III-Tubulin, dem Mikrotubuli-assoziierten Protein tau und MAP2. Diese Prozesse werden durch eine selektive Aktivierung des AT₂-Rezeptors induziert (*Cote et al., 1999*). Die AT₂-Rezeptor-vermittelten neuronalen morphologischen Differenzierungen von NG 108-15-Zellen wurden begleitet von einer Hemmung der p21ras-Aktivität und einer Erhöhung der MAP-Kinase-Aktivität (*Gendron et al., 1999*).

Die Interaktion von AT₂-Rezeptoren mit T-Typ Calciumkanälen, die in nicht-differenzierten NG108-15-Zellen (Buisson *et al.*, 1995) beobachtet werden konnte vor dem Hintergrund, dass Calcium eine wichtige Rolle innerhalb der neuronalen Differenzierung spielt (Kater und Mills, 1991), auf eine mögliche Beteiligung von AT₂-Rezeptoren an diesem Prozess hindeuten.

Des Weiteren konnte kürzlich *in vitro* an neurogenen PC12W-Zellen gezeigt werden, dass eine AT₂-Rezeptor- vermittelte Differenzierung NO-abhängig ist und diese durch Blockade von Bradykinin B₂-Rezeptoren noch weiter gesteigert werden konnte (Zhao *et al.*, 2003).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch eine AT₂-Rezeptor-Stimulation am Neuron antiproliferative Effekte vermittelt sowie Neuritenausdehnung induziert werden kann. Ebenso zeigt die Modulation im Expressionsverhalten wichtiger Proteinfilamente durch AT₂-Rezeptor-Aktivierung, dass diese Rezeptoren direkt an der neuronalen Entwicklung durch Zytoskelettorganisation beteiligt sind.

1.3.3 AT₂-Rezeptoren und neuronale Regeneration

AT₂-Rezeptoren sind nicht nur an multizellulären Reparatursystemen wie dem Prozess der Wundheilung beteiligt (Kimura *et al.*, 1992; Nakajima *et al.*, 1995; Nio *et al.*, 1995), sondern auch an der Nervenregeneration infolge einer Verletzung.

Den ersten Beweis für eine AT₂-Rezeptor-Beteiligung an sowohl apoptotischen als auch neuroregenerativen Ereignissen lieferte die AT₂-Rezeptor-vermittelte Neurofilament-M-(NF-M)-Herabregulation in einer *in vitro* Studie an PC12W-Zellen (Gallinat *et al.*, 1997). Eine verminderte NF-M-Expression konnte ebenso in Neuronen nach Nerven-Transsektion (Goldstein *et al.*, 1988; Hoffmann *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 1994a,b; Muma *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1992; Wong und Oblinger, 1987) und in Neuronen, die der Apoptose unterzogen wurden (Estus *et al.*, 1994), beobachtet werden.

Wie bereits beschrieben (1.3.2. AT₂ Rezeptoren und neuronale Entwicklung), wurde in verschiedenen neuronalen Zelllinien gezeigt, dass eine AT₂-Rezeptor-Stimulation antiproliferative Effekte ausübt und ein Neuritenwachstum induziert, die mit der Modulation der Expression wichtiger Proteinfilamente einhergehen. Die Herabregulation von MAP1B durch AT₂-Rezeptoren in PC12W-Zellen (Stroth *et al.*, 1997) ist bzgl. neuronaler Regeneration von besonderer Bedeutung, da eine MAP1B-Herabregulation in regenerierenden Neuronen nach Axotomie beobachtet werden konnte (Svensson, 1992; Woodhams, 1989).

Book und Mitarbeiter (1996) entdeckten eine Korrelation zwischen Reduktion der MAP2-Level und einem neuronalen Sterben nach peripherer bzw. zentraler Nervenläsion. Demzufolge könnte die in PC12W-Zellen beobachtete AT₂-Rezeptor-induzierte MAP2-

Hochregulation die Hypothese unterstützen, dass AT₂-Rezeptoren apoptotische Prozesse zu hemmen und neuroregenerativer Prozesse zu fördern vermögen. Auch an dieser Stelle soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass hierbei die zugrundeliegenden pathophysiologischen Bedingungen in komplexer, bisher noch nicht vollständig geklärter Weise von entscheidender Bedeutung sind. Ob der AT₂-Rezeptor also eher pro-apoptotische oder aber pro-regenerative Wirkung entfalten, ist immer davon abhängig, welcher Gesamtstimulus im jeweiligen experimentellen bzw. pathophysiologischen Modell vorliegt.

Am Modell der peripheren Nervenläsion konnte eine dramatische Hochregulation von AT₂- und, zu einem geringeren Ausmaß, auch von AT₁-Rezeptor-mRNA nach Transektion des N. ischiadicus in Spinalganglien-Neuronen und in Segmenten des Ischiasnerven adulter Ratten gezeigt werden (*Gallinat et al., 1998*). Die erfolgreiche Regeneration unter Regenerations-ermöglichenden Bedingungen (Quetschläsion des N. ischiadicus), führte außerdem zu einer kurzfristige Hochregulation von AT₂-Rezeptor-mRNA von proximal nach distal mit einem Expressionsabfall, der sich zeitgleich zur axonalen Ausdehnung einstellte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass im peripheren Nervensystem AT₂-Rezeptoren ihre neuroregenerativen Wirkungen über eine Modulation Schwann-Zell-vermittelter Aktivität ausüben, wie z.B. die Produktion neurotropher Faktoren, Myelindegeneration oder die Präparation von Schwann-Zellen für eine spätere Myelinscheidensynthese.

Eine Nervenläsion induziert die Migration von Makrophagen zur Läsionsstelle. Es kommt zur Phagozytose von Myelin und zur Interleukin-1(IL-1)-Sekretion. Als Folge dieser Ereignisse (IL-1-Sekretion, Verlust des Axonkontakts) werden die Schwann-Zellen innerhalb von 24 Stunden zur Proliferation angeregt. Diese äußert sich in *in vitro* Experimenten u.a. dadurch, dass ein durch Makrophagen konditioniertes Medium proliferationsfördernd auf Schwann-Zellen wirkt (*Baichwal et al., 1988*).

Weiterhin sind beide Angiotensin-Rezeptorsubtypen, AT₁- und AT₂-Rezeptor, an der Regulation der proteolytischen Aktivität in den die Neuronen umgebenden Strukturen beteiligt, so z.B. durch Beeinflussung des Serin-Proteasen-Inhibitors Protease Nexin-1 (PN-1) in kultivierten Schwann-Zellen (*Bleuel et al., 1995a*). Nach Verletzung des N. ischiadicus konnte gezeigt werden, dass PN-1 zum Schutze der Motorneurone vor einem Axotomie-vermittelten Zelltod induziert wird (*Houenou et al., 1995*).

Einen Hinweis, dass ANG II eine potentielle Rolle als neurotropher Faktor für ZNS-Neuronen über seinen AT₂-Rezeptor spielt, ergab die verstärkte axonale Regeneration nach AT₂-Rezeptorstimulation in postnatalen Retina-Explantaten der Ratte und kultivierten Spinalganglien-Neurone *in vitro* sowie nach Quetschung des N. opticus *in vivo* (*Lucius et al.,*

1998). ANG II (10^{-7} - 10^{-5} M) bewirkte ein signifikantes Neuritenwachstum *in vitro* (retinale Explantate und DRG-Zellen) und *in vivo* nach Läsion des N. opticus und zeigte somit seine Beteiligung an der Regeneration von Neuriten in einer konzentrationsabhängigen Weise. Beide ANG II-Effekte, *in vitro* wie *in vivo*, wurden durch den AT₂-Rezeptor vermittelt. Sie waren durch den AT₂-Rezeptor-Agonisten CGP 42112 reproduzierbar und durch den AT₁-Rezeptor-Antagonisten Losartan nicht unterdrückbar. Durch Co-Inkubation mit dem AT₂-Rezeptor-Antagonisten PD 123177 konnten sie jedoch verhindert werden. Eine Beteiligung von AT₂-Rezeptoren an diesen Ereignissen konnte ebenso mit Hilfe einer reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktions-Analyse (RT-PCR) demonstriert werden, wobei eine konzentrationsabhängige Erhöhung der AT₂-Rezeptor-mRNA, wie in vorherigen Studien am peripheren Nerven, sowohl in der Retina als auch im gequetschten N. opticus gezeigt werden konnten. Diese Ergebnisse zeigten erstmalig, dass ANG II über den AT₂-Rezeptor eine axonale Regeneration zu induzieren vermag.

Weiterhin kann ANG II durch seine Rezeptoren durch Modulation inflammatorischer Prozesse die Abläufe bei zerebraler Gehirnschämie beeinflussen. Es existieren einige Beweise dafür, dass der AT₂-Rezeptor am entzündlichen Geschehen nach einer Verletzung beteiligt sein kann. So wurde z.B. beschrieben, dass die AT₂-Rezeptor-Expression durch das Zytokin Interleukin-1 hochreguliert wird (*Matrougui et al., 1999*). Auch konnte NF- κ B, welches eine wichtige Rolle innerhalb der Entzündung spielt, durch AT₂-Rezeptor-Stimulation aktiviert werden (*Ruiz-Ortega et al., 2000*). Horiuchi und Mitarbeiter (1998) konnten ferner zeigen, dass Interferon- γ die AT₂-Rezeptor-Expression in R3T3-Zellen über die Aktivierung des intrazellulären Jak/STAT-Weges und der Produktion des Interferon-regulierenden Faktor-1 hochreguliert. Ferner ist bekannt, dass sowohl Entzündungszellen als auch ihre Produkte zum neuronalen Überleben und zur axonalen Regeneration nach Verletzung beitragen (*Richardson und Riopelle, 1994*).

Für eine erfolgreiche axonale Elongation ist neben neurotrophen Faktoren auch eine wachstumsfördernde Extrazellulärmatrix und Veränderungen im Zytoskeletts nötig. Wie schon dargestellt konnte an verschiedenen neuronalen Zellkulturmodellen (PC12W, NG108-15) gezeigt werden, dass ANG II über AT₂-Rezeptoren das Neuritenwachstum fördert und die Expression verschiedener zytoskelettärer Proteine reguliert. Weiterhin konnte an Endothelzellen demonstriert werden, dass ANG II über AT₁- und AT₂-Rezeptoren die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix verändert (*Fischer et al., 2001*).

Darüber hinaus müssen für eine erfolgreiche Reinnervation der Zielorgane die Axone zu ihren Zielregionen gelenkt werden („axon guidance“). An diesem Prozess sind neben dem Zytoskelett im Wachstumskegel auch chemoattraktive und chemorepulsive Substanzen (z.B. Netrine, Semaphorin, Collapsin) beteiligt. An Endothelzellen konnte von Wolf und Mitarbeitern (1997) gezeigt werden, dass die Sekretion des Chemokins RANTES über AT₂-Rezeptoren *in vitro* und *in vivo* verstärkt wird und dass RANTES chemoattraktiv auf Monozyten /Makrophagen wirkt.

Für einige der oben genannten Prozesse wie z.B. das Überleben von Zellen, die axonale Elongation oder „axonal guidance“ wurde also bereits eine Beteiligung von AT₂-Rezeptoren nachgewiesen. Die den AT₂-Rezeptor-vermittelten neuroprotektiven Wirkungen zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher erst sehr unvollständig untersucht.

Auch bleibt die Frage offen, ob es sich bei den beschriebenen ANG II-Effekten um direkte Wirkungen auf Ganglienzellen oder um indirekte Wirkungen über Glia- oder Schwann-Zellen handelt.

1.3.4. Zelltypspezifische Expression von AT₂-Rezeptoren

Für die Expression der AT₁- und AT₂-Rezeptoren kommen im peripheren Nervensystem neben Endothelzellen und Fibroblasten hauptsächlich Schwann-Zellen in Frage.

Dies hat folgende Gründe:

1. R3T3-Fibroblasten exprimieren AT₂-Rezeptoren in Zellkultur nur bei Erreichen der Konfluenz in verstärktem Maße (Dudley und Summerfelt., 1993). Als Folge der Axotomie peripherer Nerven proliferieren Fibroblasten stark, erreichen jedoch bei weitem nicht die Zelldichte wie *in vitro*. Da Bleuel und Mitarbeiter (1995a) außerdem keine AT₂-Rezeptoren in Fibroblasten-Primärkulturen nachweisen konnte, kann davon ausgegangen werden, dass diese Zellen, wenn überhaupt, nur einen geringen Anteil an der detektierten AT₂-Rezeptor-mRNA ausmachen.

2. Mikrovaskuläre Endothelzellen der Ratte exprimieren beide Angiotensin-Rezeptorsubtypen (Stoll *et al.*, 1995 a, b). Da über AT₁- und AT₂-Rezeptoren in diesen Zellen die Regulation verschiedener Matrixproteine vermittelt wird (Fischer *et al.*, 2001), kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest ein Teil, der von Gallinat und Mitarbeitern (1998) beschriebenen Zunahme der AT-Rezeptor mRNA-Expression durch die einsetzende Neovaskularisierung bedingt ist. Im Vergleich zu den Schwann-Zellen sind jedoch nur wenige

Endothelzellen in der Peripherie der Nerven vorhanden. Dies lässt vermuten, dass diese Zellen, wenn überhaupt nur zu einem geringen Teil zu der Änderung der mRNA-Expression beitragen.

3. Schwann-Zellen sind in der Basallamina peripherer Nerven die vornehmlich vorhandene Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass Schwann-Zellen *in vitro* nicht nur AT₁- und AT₂-Rezeptoren (Bleuel *et al.*, 1995 a, b), sondern auch Angiotensinogen und Renin exprimieren und dass diese Zellen ANG II in das Kulturmedium sezernieren (Bleuel *et al.*, 1995 a, b). Weiterhin spiegelt das Expressionsmuster der AT₂-Rezeptor-mRNA nach Nervenquetschung den gut charakterisierten Zeitverlauf der Schwann-Zellen-Aktivität nach peripherer Nervenverletzung wieder (Morris *et al.*, 1972). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese steht die Beobachtung von Nickols und Mitarbeiter (2003), die beschreibt, dass der nukleare Transkriptionsfaktor-kappa B (NF-κB), als essentielles Signal für Differenzierung, in Ischiasnerven der Ratte in noch nicht myelinisierten Schwann-Zellen vermehrt gefunden werden konnte, wohingegen es adulten, myelinisierten Schwann-Zellen kaum noch gefunden werden konnte. Auch an Schwann-Zell-Kulturen sensorischer Neurone konnte die gleiche Beobachtung gemacht werden, nämlich dass eine NF-κB-Expression immer mit einer aktiv voranschreitenden Myelinisierung einherging. Zelllinien von Mäusen mit funktionell beschädigtem NF-κB zeigten entsprechende Verzögerungen in ihrer Myelinisierung. (Nickols *et al.*, 2003).

4. Unter diesem Aspekt ebenfalls von Interesse zeigen sich invasierende Makrophagen. Es deuten vermehrt Untersuchungen darauf hin, dass Entzündungszellen und deren Produkte, wie Zytokine, zum neuronalen Überleben und zur axonalen Regeneration nach Verletzung beitragen (Richardson und Lu, 1994). So konnte kürzlich gezeigt werden, dass AT₁-Rezeptor-Antagonisten eine Hemmung der entzündlichen Komponenten im Zusammenhang mit atherosklerotischen Verletzungen induzieren (Dol *et al.*, 2001). Weiterhin könnte der AT₂-Rezeptor an entzündlichen Ereignissen nach Gewebsverletzung beteiligt sein, da bekannt ist, dass die AT₂-Rezeptor-Expression durch das Zytokin Interleukin-1 (IL-1) hochreguliert wird (Buisson *et al.*, 1995) und der proinflammatorische Transkriptionsfaktor NF-κB via AT₂-Rezeptor-Stimulation aktiviert werden kann (Ruiz-Ortega *et al.*, 2000). Es konnte ebenso gezeigt werden, dass Interferon γ die AT₂-Rezeptor-Expression in R3T3-Zellen über eine Aktivierung des intrazellulären Jak/STAT-Weges und der Produktion von Interferon-regulierendem Faktor-1 hochreguliert (Horiuchi *et al.*, 1998).

Demzufolge ist es möglich, dass die Stimulation von AT₂-Rezeptoren in Makrophagen nach AT₁-Rezeptor-Blockade von essentieller Bedeutung in Zusammenhang mit der verbesserten inflammatorischen Antwort ist, z.B. durch Erhöhung der Makrophagen-Phagozytose-Aktivität, welche ein Schlüsselereignis innerhalb peripherer Nervenregeneration darstellt. Darüber hinaus könnten freigesetzte Zytokine wie Interleukin-1, -6 oder TNF- α einen Stimulus zur Remyelination über Aktivierung des NF- κ B-Systems in Schwann-Zellen liefern.

1.4 Zielsetzung

Die physiologischen Funktion des AT₂-Rezeptors ist noch weitgehend ungeklärt. Außer früheren Erkenntnissen, dass ANG II über den AT₂-Rezeptor das Zellwachstum hemmt und die Zelldifferenzierung fördert, konnte auch eine direkte Beteiligung des AT₂-Rezeptors an neuroregenerativen Prozessen gezeigt werden.

Es ist bekannt, dass der AT₂-Rezeptor ubiquitär im fetalen Gewebe exprimiert ist, seine Expression im adulten Organismus jedoch auf wenige Organe beschränkt bleibt. Der erstmalige direkte Nachweis, dass AT₂-Rezeptoren an neuronalen Differenzierungsvorgängen beteiligt sind, konnte von Meffert und Mitarbeitern (1996) erbracht werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von PC12W-Zellen mit ANG II das Auswachsen von Neuriten induziert. Während der AT₁-Rezeptor-Antagonist Losartan diese ANG II-vermittelten Effekte nicht beeinflusste, konnte der AT₂-Rezeptor-Antagonist PD 123177 das Neuritenwachstum vollständig unterbinden. Weiterhin verstärkte ANG II die NGF-induzierte morphologische Differenzierung, ein Effekt, der ebenfalls AT₂-Rezeptor vermittelt war.

Weitere Untersuchungen deuteten auf eine Rolle dieser Rezeptoren innerhalb der Regulation von Proteinfilamenten in neuronalen Zellen hin. In PC12W-Zellen kam es nach AT₂-Rezeptor-Stimulation zur Herabregulation von Neurofilament-M (Gallinat *et al.*, 1997), während in diesen Zellen die Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP1B)-Expression abgeschwächt, β -Tubulin und MAP2 hochreguliert wurden (Stroth *et al.*, 1997).

Erste Hinweise auf eine physiologische Rolle dieses Rezeptorsubtyps im Prozess der peripheren Nervenregeneration konnte von Gallinat und Mitarbeitern (1998) erbracht werden. Ihre Experimente haben die drastische und dauerhafte Hochregulation der AT₂- und, nur zu einem geringeren Ausmaß, der AT₁-Rezeptor mRNA nach Axotomie und Quetschläsion in der adulten Ratten gezeigt.

Der erste *in vivo* Nachweis für die Rolle von ANG II als neurotropher Faktor folgte daraufhin von Lucius und Mitarbeitern (1998). Es konnte gezeigt werden, dass ANG II über seinen AT₂-Rezeptoren die axonale Elongation postnataler Retina-Explantaten und Spinalganglien-Neuronen der Ratte *in vitro*, sowie die axonalen Regeneration retinaler Ganglienzellen nach Quetschung des N. opticus *in vivo* verbessert.

Ein funktioneller Nachweis der AT₂-Rezeptor-vermittelten Neuroregeneration ist jedoch bislang nicht erbracht worden.

Aufgrund dieser Erkenntnisse stellten sich daher für die hier vorliegende Dissertation folgende Fragestellungen und Ziele:

- 1. Etablierung eines experimentellen Modells zur Untersuchung des funktionellen Regenerationsverlaufes nach Verletzung peripherer Nerven in vivo mit*
- 2. anschließender morphologischer Beweisführung.*
- 3. Untersuchung der Auswirkungen einer chronischen lokalen Applikation unterschiedlicher ANG II-Konzentrationen an dem Ort peripherer Nervenläsion.*
- 4. Untersuchung der Auswirkungen einer zeitlich verlängerten Applikation der ANG II-Konzentration, die sich zuvor als am effektivsten erwiesen hat, um zu klären, ob ANG II in dem hier gewählten Modell zu einer Beschleunigung oder sogar zu einer Verbesserung der maximal erreichbaren funktionellen Nervenregeneration führt.*
- 5. Untersuchung der pathophysiologischen Relevanz von AT₁- und AT₂-Rezeptoren für die neuronale Regeneration, sowohl bei physiologischen Konzentrationen des endogenen RAS als auch bei exogener ANG II-Applikation, mittels jeweils selektiver Rezeptor-Antagonisten.*

2. Methodik

2.1 Studienaufbau

2.1.1 Versuchstiere und Haltung

Alle Experimente dieser Arbeit wurden an männlichen Sprague Dawley Ratten (Charles River Viga GmbH, Sulzfeld, Deutschland) mit einem initialen Gesamtkörpergewicht zwischen 250-300 g vorgenommen. Die Durchführung der tierexperimentellen Versuche erfolgte unter der Berücksichtigung des deutschen Tierschutzgesetzes von 1993 (§ 8 Abs. 1 des TierSch.G., Anlage 1, Durchführung von Tierversuchsvorhaben). Die Tiere wurden in Einzelkäfigen unter temperaturkontrollierten Bedingungen im 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus unter individueller medikamentöser Betreuung gehalten. Alle Ratten hatten freien Zugang zu standardisiertem Diätfutter (Altromin® Altromin International GmbH u. Co.Kg., Lage-Lippe, Deutschland) und Trinkwasser.

Um den erheblichen experimentellen Aufwand und die Zahl der verwendeten Tiere im vertretbaren Rahmen zu halten, wurden in der Literatur beschriebene Methoden modifiziert (*de Koning et al., 1986; Wang et al., 1997*), die unter vergleichbaren Bedingungen bereits repräsentative und statistisch aussagefähige Ergebnisse lieferten.

2.1.2 Experimentelles Protokoll

Zur Untersuchung, in wieweit neurotrophe Faktoren einen Einfluss auf die Nervenregeneration zeigen, musste zunächst ein geeignetes Modell etabliert werden.

Dabei mussten folgende Parameter berücksichtigt werden:

1. Möglichkeit der Wiederherstellung der Nervenfunktion,
2. präzise Wirkstoffapplikation an der Nervenläsion,
3. über einen Zeitraum konstante Wirkstoffkonzentration am Wirkort,
4. keine Regenerationseinschränkung durch das Modell,
5. Stabilität der Wirkstoffe bei Körpertemperatur,
6. kein Wirkstoffverlust durch Adhäsion am Applikationssystem,
7. Möglichkeit der Kontrolle des Regenerationsverlaufs *in vivo*,
8. aussagekräftige Verlaufskontrolle *in vivo*,
9. morphologische Untersuchung.

2.1.2.1 Protokoll zur Durchführung der tierexperimentellen Versuche

Im folgenden soll die zeitliche Abfolge vom operativen Eingriff wie den einzelnen funktionellen Tests zur Kontrolle des Regenerationsverlaufs dargestellt werden.

Tag 0	Fußabdrücke Quetschläsion des N. ischiadicus und Implantation einer osmotischen Minipumpe
Tag 10	Beginn der Elektrostimulation
Tag 17	Beginn der Fußabdruck-Abnahme
Tag 21	Perfusion

Am Tag 0 wurden die Ratten gewogen und die Fußabdrücke (normal, unverletzt) genommen. Nach der Quetschläsion und Implantation einer osmotischen Minipumpe wurden die Tiere täglich beobachtet. Am zehnten Tag begann die Elektrostimulation und wurde beendet, wenn die Ratte an drei aufeinanderfolgenden Tagen darauf positiv mit einem Zurückziehen der Pfote reagierte. Ab Tag 17 wurden täglich Fußabdrücke genommen.

Das Körpergewicht aller Tiere wurde wöchentlich bestimmt. Nach 21 Tagen wurden die Ratten in tiefer Chloralhydratnarkose perfundiert und beide Ischiasnerven zur weiteren histologischen Aufbereitung entnommen.

Neben der 21-tägigen Versuchsperiode wurde zusätzlich ein Langzeitversuch über 32 Tage angeschlossen.

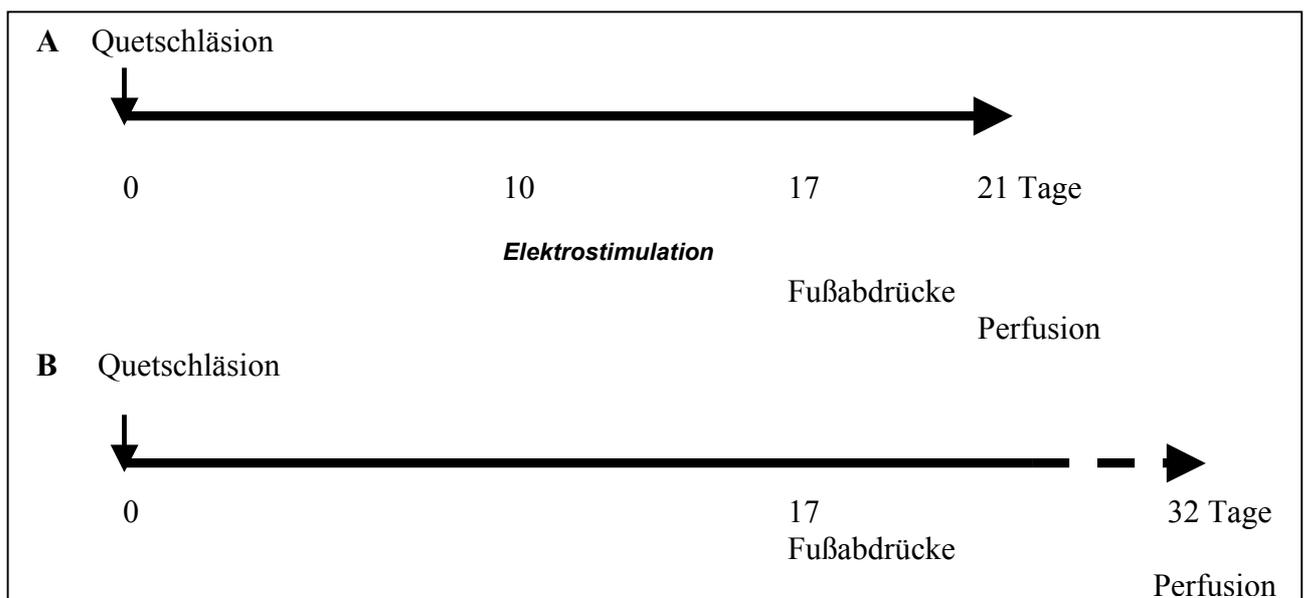


Abbildung 4: Experimentelles Protokoll;

A: Behandlungsdauer 21 Tage, B: Behandlungsdauer 32 Tage (Langzeitstudie)

2.1.2.2 Experimentelle Gruppen

Pro Gruppe wurden 10-13 Tiere verwendet.

Konzentrationsabhängige Beeinflussung durch ANG II

Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve wurden die osmotischen Minipumpen mit ANG II-Lösung folgender Konzentrationen befüllt:

- ANG II 10^{-11} mol/l
- ANG II 10^{-9} mol/l
- ANG II 10^{-7} mol/l

Rezeptoranalyse bei exogen-appliziertem ANG II

Zur Bestimmung des für die Regeneration verantwortlichen ANG II-Rezeptorsubtypen bei exogener ANG II-Zufuhr wurden osmotischen Minipumpen mit einer Kombination aus der zuvor als am effektivsten ermittelten ANG II-Konzentration und dem selektiven AT₂-Rezeptor-Antagonisten PD 123319 oder dem selektiven AT₁-Rezeptor-Antagonisten Losartan befüllt:

- PD 123319 10^{-7} mol/l + ANG II 10^{-11} mol/l
- Losartan 10^{-7} mol/l + ANG II 10^{-11} mol/l

Rezeptoranalyse des endogenem ANG II

Zur Bestimmung des für die Regeneration verantwortlichen ANG II-Rezeptorsubtypen bei physiologischen Konzentrationen des endogenen RAS wurden osmotischen Minipumpen ausschließlich mit den beiden selektiven Rezeptor-Antagonisten in folgender Konzentration befüllt:

- PD 123319 10^{-7} mol/l
- Losartan 10^{-7} mol/l

Kombinierte Blockade von AT₁- und AT₂-Rezeptoren

Um eine vollständige Blockade beider ANG II-Rezeptoren zu erzielen, wurden osmotische Minipumpen mit beiden Rezeptor-Antagonisten in der jeweils zuvor verwendeten Dosierung in Kombination mit ANG II befüllt:

- PD 123319 10^{-7} mol/l + Losartan 10^{-7} mol/l + ANG II 10^{-11} mol/l

Als Positivkontrolle diente NGF in einer Konzentration von 0,22 µg/ml, als Negativkontrolle physiologische Kochsalz-Lösung. Für die Langzeitstudie wurde eine ANG II-Lösung (10^{-11} mol/l) gegen physiologische Kochsalz-Lösung eingesetzt. Vor der OP wurde jeweils der Pumpeninhalt verblindet.

Die niedrigste verwendete Konzentration für eine exogen-applizierte ANG II-Lösung war 10^{-11} mol/l, da laut Bleuel und Mitarbeitern (1995a) im serumfreien, konditionierten Medium von Schwann-Zellen eine dieser Konzentration entsprechende Menge von $4,22 \pm 0,24$ fmol/ml ANG II freigesetzt wird. Die für diese Versuchsreihe gewählte minimale exogene ANG II-Zufuhr entsprach somit dem vorherrschenden physiologischen Milieu.

Die beiden anderen höher dosierten Konzentrationen von 10^{-9} mol/l und 10^{-7} mol/l wurden empirisch gewählt, nachdem in Vorversuchen festgestellt worden war, dass eine exogene ANG II-Applikation von 10^{-5} mol/l im verwendeten experimentellen Modell *in vivo* bereits zu hoch konzentriert war, da sie eine neuronale Regeneration sogar verzögerte, obwohl sie *in vitro* noch eine deutliche Ausprossung von Neuriten in kultivierten PC12W-Zellen hervorgerufen hatte (Meffert et al., 1996).

2.1.3 Experimentell erfasste Parameter

Funktionelle Regeneration:

- Fußspanne zwischen 2. und 4. Zeh am Tag 17-20
- Zeitpunkt bis zu einer positiven Reaktion auf die Elektrostimulation

Morphologie:

- GAP-43-AK-Färbung an Nervensegmenten distal der Nervenläsion
- Myelinscheidenfärbung mit Paraphenylendiamin und anschließender morphometrischer Analyse von Axondurchmesser und Myelinscheidendicke
- strukturelle Regeneration mit Hilfe elektronenmikroskopischer Bilder

2.2 Methodik im Tierversuch

2.2.1 Operative Methoden

2.2.1.1 Quetschung des Nervus. ischiadicus

Zur Durchführung der peripheren Quetschläsion wurden die Tiere zunächst durch eine intraperitoneale Injektion mit Chloralhydrat (40 mg/kg) anästhesiert. Der folgende Eingriff wurde unter Einhaltung steriler Kautelen durchgeführt. Die Narkosetiefe wurde durch Testung von Flexorreflexen kontrolliert. Bei suffizienter Narkose wurden die unteren Extremitäten des auf dem Bauch liegenden Tieres abduziert und in dieser Stellung mit Klebebändern fixiert.

Nach Rasur der linken Rückenseite einschließlich der linken Flanke wurde die Haut über eine Länge von 2,5 cm in der proximalen Hälfte der Linie zwischen Trochanter major und dem Kniegelenk geöffnet. Der N. ischiadicus wurde nach stumpfer Aufspreizung des M. vastus lateralis und des M. biceps femoris dargestellt. Dieser wurde vom Bindegewebe befreit und mobilisiert. Der Nerv wurde mit einer Uhrmacherpinzette (Dumont Nr. 7) über 30 Sekunden gequetscht. Nach der Quetschung zeigte die betroffene Stelle über den gesamten Durchmesser des Nerven eine durchsichtige Konsistenz. Die Läsionsstelle wurde mittels einer sterilen 9-0 Naht (Eticon, Norderstedt) durch die Epineuralscheide markiert.

2.2.1.2 Lokale Wirkstoffadministration

Die lokale Administration neurotropher Substanzen am Ort der peripherer Nervenläsion über einen konstanten Zeitraum wurde mittels einer osmotischen Minipumpe plus Katheter erreicht. Die Minipumpe wurde an der linken Flanke subkutan implantiert. Ein Polyethylen-Katheter (Durchmesser 1,14 mm, Gesamtlänge 4 cm), der zuvor mit Zahnzement an der Pumpenöffnung befestigt worden war, wurde subkutan zur Läsionsstelle hin getunnelt. Dort wurde er im benachbarten Muskelgewebe an einer zuvor durch Heißluft hervorgerufenen Auftreibung fixiert, um sein Verrutschen zu verhindern. Die Muskelloge wurde sorgfältig zugenäht und die beiden Hautschnitte mit Wundclips verschlossen. Das OP-Gebiet wurde desinfiziert. Die Wundverhältnisse und der Sitz der Pumpe wurden regelmäßig kontrolliert. Die Wundclips fielen nach Abheilung von selbst ab.

Zur Wirkstoffapplizierung wurden osmotische Minipumpen (Alzet Modell 2002, Charles River Wiga, Sulzfeld) mit einem Befüllungsvolumen von 200 µl und einer Pumprate von 0,5 µl/h über einen Zeitraum von 14 Tagen verwendet. Die Pumpen wurden mit den einzelnen Wirkstofflösungen (Kapitel 2.1.2.2 *Experimentelle Gruppen*) befüllt und 24 Stunden vor der OP in physiologischer Kochsalzlösung bei 37°C zum Vorpumpen inkubiert.

Für die Langzeit-Studie wurden osmotische Minipumpen mit einer Pumprate von 0,25 µl/h über 28 Tage (Alzet Modell 2004, Charles River Wiga, Sulzfeld) gewählt.

2.2.1.3 Konstanzprüfung der Pumpfunktion und ANG II-Konzentration

Um sicherzustellen, dass der Pumpeninhalt in unveränderter Konzentration an der Läsionsstelle appliziert wird und kein Wirkstoff weder in der Minipumpe noch am Katheter adhärert, wurden 3 Pumpen plus Katheter *in vitro* bei 37°C über 20 Tage in physiologischer Kochsalzlösung inkubiert. Der Pumpeninhalt wurde jeweils in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen. Das System wurde hermetisch abgedichtet. Im Anschluss wurde der ANG II-Gehalt der aufgefangenen Lösung durch einen Radioimmuno-Assay bestimmt.

Des Weiteren werden zur Überprüfung der ANG II-Stabilität bei Körpertemperatur über die gesamte Versuchsperiode 3 Eppendorfgefäße mit einer ANG II-Lösung (500 pg/50 µl) über 16 Tage in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Es wurden täglich aus jedem Gefäß jeweils zwei Proben à 100 µl entnommen, bei -20°C tiefgefroren und zum Schluss mittels Radioimmuno-Assay bestimmt.

Radioimmuno-Assay für ANG II (ANG II-RIA)

Das Prinzip des RIA beruht auf einer Gleichgewichtsreaktion, bei der radioaktiv markiertes Antigen (Tracer) und endogenes Antigen aus der Probe um einen Antikörper konkurrieren. Durch Zugabe unterschiedlicher Mengen Antigen zu einer konstanten Menge Antikörper und Tracer läßt sich eine Standardkurve berechnen, die einen idealerweise linearen Zusammenhang zwischen den gezählten „counts per minute“ (cpm) und der Konzentration des Antigens in der Probe herstellt (Eckert, 1976).

Ansatz der verwendeten Lösungen

60,5 g TRIS (Tris-hydroxymethylaminomethan) (MG 121,14) wurden mit 1 g Neomycinsulfat versetzt und nach Auffüllen mit Wasser (Milliporequalität) auf 5 l (graduierter Meßbecher) mit konzentrierter Essigsäure auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend wurde der Puffer durch einen Faltenfilter in die Vorratsflasche filtriert und bei 4 °C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde im benötigten Volumen 0,1 % BSA (Rinderserumalbumin) und 0,1 % Triton X-100 gelöst. Das Triton diente einem besseren Abtrennen des Überstands nach dem Zentrifugieren.

Aktivkohle-Suspension

8 g Holzkohle und 1 g Dextran T 70 wurden in 240 ml RIA-Puffer ohne BSA durch 10 min Rühren vor jedem Gebrauch suspendiert. Die Kohlesuspension wurde bei 4 °C aufbewahrt.

Standards

Es wurden 100-500 µg Peptid auf einer Präzisionswaage in BSA-beschichtete Eppendorfgläser eingewogen und mit Wasser (Milliporequalität) so verdünnt, daß unter Berücksichtigung des Peptidgehaltes der Charge eine Konzentration von 1 mg/ml erreicht wurde. Die Stammlösung wurde in Schritten von 1:100 mit Wasser (Milliporequalität) auf 10 µg/ml und dann auf 100 ng/ml verdünnt (10 µl konz. Lösung und 990 µl Wasser (Milliporequalität)).

Für die Herstellung einer größeren Menge ANG II-Standards gleicher Konzentration wurde folgendermaßen vorgegangen:

Ein silikonisierter Meßkolben (50 ml) wurde bei Raumtemperatur mit Wasser (Milliporequalität) bis zur Marke aufgefüllt und anschließend in einem Eisbad auf 4 °C abgekühlt. 50 µl Angiotensinstandard (10 µg/ml) wurden hinzupipettiert und die Lösung gut durchmischt. Nach Umfüllen in ein silikonisiertes Becherglas (4 °C, auf Eis) wurde die gekühlte Standardlösung (500 pg/ 50 µl) in BSA-beschichtete Eppendorfgläser aliquotiert. Zur Herstellung der Standardverdünnungen vor jedem RIA wurde eine 1:2 Serienverdünnung in 10 Stufen (200 µl Standard + 200 µl RIA-Puffer) auf Eis pipettiert. Die Standards reichten von 250 bis 1 pg/ 50 µl.

Antikörper und Verdünnungen

Das Antiserum gegen ANG II wurde aus Kaninchen gewonnen. Es wurde das Antiserum 9225 in einer Verdünnung von 1:120000 verwendet (Antiserum 9225, P. Admiral (Amsterdam, NL)).

Kreuzreaktionen der Antikörper

Die Zuverlässigkeit und Aussagekraft eines RIA hängt von der Spezifität des verwendeten Antiserums ab. Die Kreuzreaktion eines Substrats wird in % Kreuzreaktivität angegeben und durch den Vergleich einer Verdünnungsreihe des Substrats mit Standards ermittelt. Die Kreuzreaktion des ANG II-Antikörpers 9225 mit ANG I, ANG (2-10), ANG (1-7) beträgt weniger als 0,2 %, mit ANG III 55 %, mit ANG IV 73 % und mit ANG (4-8) 100 %

¹²⁵I-ANG II-Verdünnung

¹²⁵I-markiertes ANG II wurde so mit RIA-Puffer verdünnt, dass in 50 µl etwa 5000 Impulse pro Minute gezählt wurden.

Englandstandards

Zu jedem RIA wurden zusätzlich sogenannte Englandstandards mitgemessen, deren theoretische Konzentration für den ANG II RIA bei 10, 20 und 40 pg/ 50 µl liegen. Die Aliquots der Englandstandards wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Durchführung

Es wurden 50 µl markiertes ANG II, 50 µl Probe und 450 µl RIA-Puffer in konischen RIA-Röhrchen aus Polyacryl 20 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubation wurden 200 µl Kohlesuspension über eine Dosierpumpe oder mit Hilfe einer Multipipette hinzugefügt, eine Minute geschüttelt und 20 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Radioaktivität im Sediment (Pellet) im Gamma-Counter 2 Minuten gemessen.

Die Auswertung erfolgte per Computer anhand der Standardkurve, die durch Verbinden der Messwerte des Standards durch eine Spline-Funktion erhalten wurde. Das Detektionslimit wurde bei jedem Assay vom Computer automatisch angegeben. Es lag im Mittel bei 1,2 pg.

2.2.2 Funktionelle Kontrolle der Nervenregeneration in vivo

Zur Charakterisierung und Beurteilung des zeitlichen Verlaufs peripherer Regeneration nach Ischiasläsion wurden die Tiere zwei funktionellen, nicht-invasiven Tests unterzogen. Zum einen wurden die Fußabdrücke des verletzten Hinterfußes vermessen und zum zweiten wurde eine elektrische Stimulation der Fußsohle durchgeführt.

2.2.2.1 Fußspannenanalyse

Die Fußspannenanalyse stellt eine Methode zur Quantifizierung der funktionellen Regeneration nach Läsion des N. ischiadicus dar. Sie wurde erstmals von de Medinaceli und Mitarbeitern beschrieben (1982) und von Bain und Mitarbeitern modifiziert (1989).

Es handelt sich um eine nicht-invasive Methode, mit deren Hilfe die Kombination aus sensorischer und motorischer Regeneration bestimmt werden kann. Sie ist darüber hinaus zur zeitlich fortlaufenden Regenerationsbestimmung am gleichen Tier geeignet. Wiethölter und Mitarbeiter (1990) konnten zeigen, dass Veränderungen innerhalb der Fußabdruck-Parameter den Veränderungen im Elektromyogramm in einem progressiven sensorischen und

motorischen Neuropathiemodell entsprechen. Die zu bestimmenden Parameter bestehen aus der Fußspanne zwischen dem 1. und 5. sowie zwischen dem 2. und 4. Zeh. Diese korrelieren statistisch zum Grad der Nervenverletzung am N. ischiadicus (*Bain et al., 1989*).

Die Ratten wurden vor und nach der Operation einer Fußspannenanalyse unterzogen wie sie bei Wang und Mitarbeitern beschrieben wurde (*1997*). Hierbei wurden an den Tagen 17, 18, 19 und 20 postoperativ für alle Tiere Fußabdrücke erstellt. Dabei wurde die linke hintere Fußsohle mit Hilfe eines Stempelkissens angefärbt. Danach liefen die Tiere frei über ein weißes DIN A4 Blatt. Die Fußspanne während des Laufens wurde als Distanz zwischen dem 1. und 5. Zeh, sowie zwischen dem 2. und 4. Zeh definiert (*Abbildung 5*).

Dies stellt einen zuverlässigen und reproduzierbaren Index zur Bestimmung der funktionellen Regeneration dar, der nicht durch die Laufgeschwindigkeit der Tiere beeinflusst wird (*Walker et al., 1994*). Zur Analyse wurden jeweils drei Fußabdrücke pro Tier herangezogen. Die resultierenden Mittelwerte für einzelne Tiere wurden zur Berechnung der Mittelwerte der jeweiligen Gruppe verwendet. Mittelwert und Standardabweichung jeder Gruppe wurden angegeben. Da für die Zehenspanne zwischen dem 1. und 5. Zeh wie für die zwischen dem 2. und 4. Zeh vergleichbare Werte erhalten wurden, sind im folgenden nur die zuletzt erwähnten Ergebnisse für Tag 20 aufgeführt, da hier die Unterschiede am deutlichsten ausgeprägt waren.

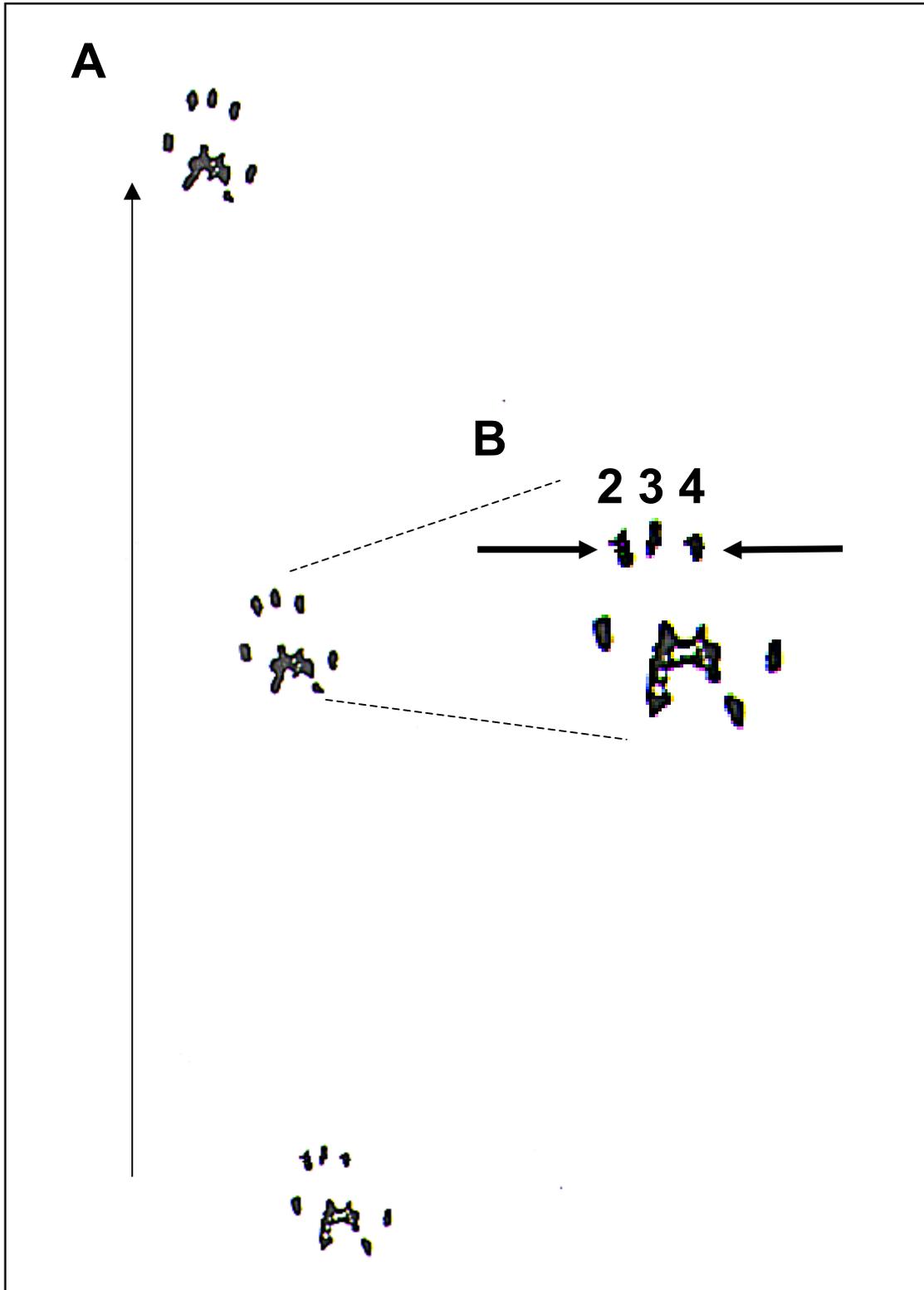


Abbildung 5: Fußabdruckanalyse mit 2-4-Fußspanne. Dargestellt sind **A)** ein typisches Beispiel dreier hintereinander abfolgender Fußabdrücke und **B)** am vergrößerten Abdruck die Meßpunkte für die Zehenspanne zwischen 2. und 4. Zeh.

2.2.2.2 Reizantwort auf elektrische Stimulation

Mit Hilfe der Elektrostimulation lässt sich der Effekt neurotropher Substanzen auf die Regenerationsgeschwindigkeit der sensorischen Funktion nach peripherer Nervenläsion bestimmen. Die hier beschriebene lokale Applikation eines kleinen elektrischen Stromes stellt einen präzisen und schnellen Test zur Verlaufskontrolle der sensorischen Funktionswiedererlangung dar. Es lässt sich nicht nur die Wachstumsgeschwindigkeit der aussprossenden Nervenfasern verfolgen, sondern auch der Reifegrad der sensorischen Funktion bestimmen.

Zur elektrischen Stimulation wurde eine 540 V Schockquelle mit einem Standardserienwiderstand von 390 kOhm und einem schrittweise regelbaren Widerstand von 0-5 mOhm verwendet. Der variable Widerstand wurde so justiert, dass er einen Strom von 0,1 mA gibt, wenn die Haut den Kreis zwischen den zwei Polen schließt. Die Pole bestehen aus zwei silberummantelten Kupferdrähten (Durchmesser 1mm) in einem Abstand von 3 mm. Der Hautwiderstand der Fußsohle der Ratten, der zwischen den Tieren variiert, ist relativ klein im Vergleich zum Apparatwiderstand, daher ist ein konstanter Stimulus möglich (*de Koning et al., 1986*).

Zur Stimulation der Fußsohle wurden die Ratten in der Hand immobilisiert. Nun konnte die sensorische Funktion der Fußsohle getestet werden, indem die Elektroden platziert wurden (*Abbildung 6*). Eine gesunde Ratte zog ihre Pfote sofort zurück, sobald die Fußsohle den Stromkreis schließt. Eine positive Antwort wurde gezählt, wenn die Ratte an drei aufeinander folgenden Tagen, die Pfote zurückzog.

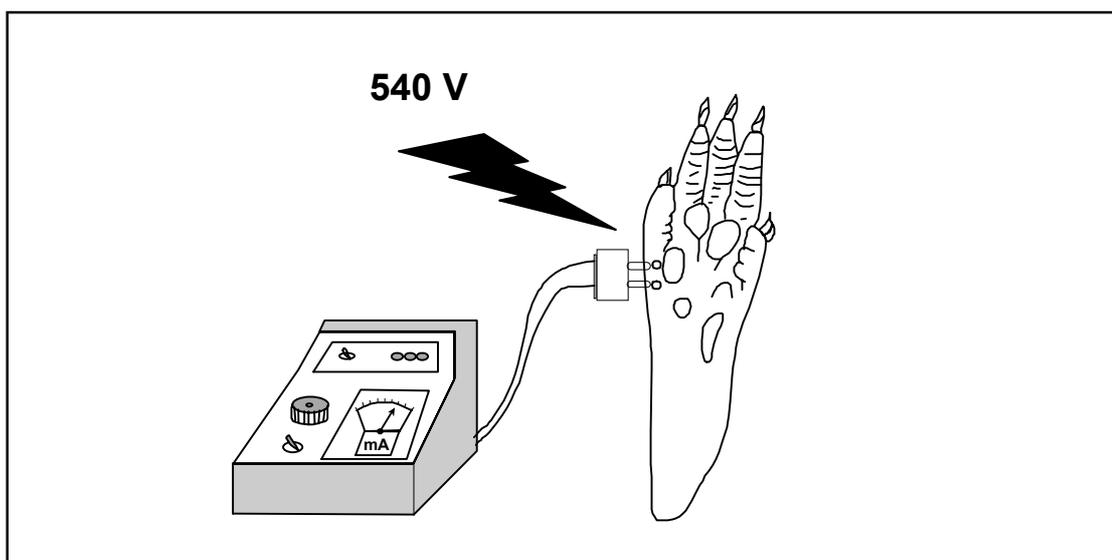


Abbildung 6: 540 V-Schockquelle mit Testpunkt für die Elektrostimulation

2.3 Gewebeentnahme und histologische Aufbereitung

2.3.1 Gewebeentnahme

Zur Entnahme der beiden Ischiasnerven zur histologischen Aufbereitung wurden die Ratten perfundiert. Die unterschiedlichen sich anschließenden Färbetechniken forderten jeweils spezielle Fixierungen.

2.3.1.1 Gewebefixierung und Präparation für GAP-43-Färbung

Nach Narkotisierung mittels intraperitonealer Injektion von Chloralhydrat-Lösung (100 mg/kg) wurde ein Teil der Ratten mittels transkardialer Perfusion zunächst mit körperwarmer PBS-Lösung und anschließend mit kalter Paraformaldehyd/PBS 4 % (pH 7,4)-Lösung getötet. Danach wurde beidseits der N. ischiadicus entnommen. Vom ipsilateralen N. ischiadicus wurde ein 20 mm langes Segment distal der Quetschläsion präpariert. Das Gewebe wurde für 24 Stunden in 4 % iger Paraformaldehyd/PBS (pH 7,4)-Lösung im Kühlschrank gelagert, um danach in 0,1 % ige Paraformaldehyd/PBS-Lösung umgebettet zu werden. Der kontralaterale N. ischiadicus diente als interne Kontrolle.

Die Nerven wurden in Tissuetek® eingebettet und 5 µm dünne, ca. 10 mm lange Kryostat-Längsschnitte 10 mm distal der Quetschläsion auf gelatinierte Objektträger aufgezogen.

2.3.1.2 Gewebefixierung und Präparation zur Myelinscheidenfärbung und Elektronenmikroskopie

Für die morphologischen Studien wurden die Tiere ebenfalls mit Chloralhydrat durch intraperitoneale Injektion anästhesiert und eine *in situ*-Perfusion des rechten und linken N. ischiadicus vorgenommen. Die Perfusion erfolgte hierbei zur Myelinscheidenfärbung mit anschließender morphometrischen Analyse am Tag 21 sowie für die elektronenmikroskopischen Auswertung am Tag 10 und Tag 21 nach Quetschläsion.

Die Nerven wurden entnommen und sofort für 2 Stunden in 6% ige Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Anschließend wurden sie in 3% iger Glutaraldehyd-Lösung umgebettet und im Kühlschrank aufbewahrt. Danach wurden die Nerven in Araldit eingebettet.

Aralditeinbettung

Die Nervenstückchen wurden zunächst mit Phosphatpuffer nach Sørensen gespült, bevor sie mit 2 % iger Osmiumsäure postfixiert wurden. Daraufhin wurden sie mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

Dehydration:

- 2 x 5 min in 50 % Ethanol
- 2 x 5 min in 70 % Ethanol
- 2 x 5 min in 90 % Ethanol
- 2 x 10 min in 100 % Ethanol
- 2 x 10 min in Propylenoxid

Einbettung

Anschließend wurden die Nervensegmente in Araldit als Flacheinbettung eingebettet und bei 65 °C polymerisiert. 0,5/1 µm dünne Querschnitte wurden 10 mm distal zur Quetschläsion erhalten.

2.3.2 Histologische Aufbereitung

Neben einer GAP-43-Färbung („growth associated protein-43“), mit deren Hilfe regenerierende Axone selektiv markiert werden können, erfolgte eine Myelinscheidenfärbung mit anschließender morphometrischen Analyse der Axonzahl und der Myelinscheidendicke sowie eine elektronenmikroskopische Auswertung.

2.3.2.1 GAP-43-Färbung

Die eingebetteten Nerven wurden gegen GAP-43 gefärbt, um die neu ausgewachsenen Nervenfasern zu markieren. Der GAP-43-Gehalt korreliert proportional mit der Anzahl der Aussprossungen (*van der Zee et al., 1989*). Eine stärkere Farbintensität reflektiert demnach eine verbesserte neuronale Regeneration.

Eine Vielzahl immunenzymatischer Färbetechniken zur Lokalisierung von Antigenen stehen zur Verfügung. Hier fand die indirekte 3-Schritt-Methode Anwendung.

Bei dieser Technik bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Anschließend wird ein zweiter enzymmarkierter Antikörper, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers (jetzt als Antigen zu betrachten) gerichtet ist, aufgetragen. Jetzt folgt ein dritter enzymgekoppelter Antikörper, der gegen den Zweitantikörper gerichtet ist, hinzu. Sowohl der sekundäre als auch der tertiäre Antikörper sind mit dem gleichen Enzym gekoppelt.

Das Hinzufügen des 3. Antikörpers dient der weiteren Signalverstärkung, da mehrere Antikörper an das zuerst gebundene sekundäre Reagenz binden können. Dies bringt mehr Enzymmoleküle zum Gewebsantigen und bewirkt daher eine stärkere Farbintensivität. Diese

Signalamplifikation ist besonders dann hilfreich, wenn Antigene, die nur wenige Epitope besitzen, dargestellt werden sollen.

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) :

Die verwendete PBS-Lösung bestand aus 2,8 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,5 mM MgCl₂, 140 mM NaCl und 8,1 mM Na₂HPO₄.

Protokoll

Zunächst erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen. Dafür wurde wie folgt verfahren:

- 10 min in eisgekühltem Aceton spülen
- 3 x 5 min in PBS waschen
- 20 –30 min in Methanol/Wasserstoffperoxidlösung 30 % (9+1) spülen
- 3 x 5 min in PBS waschen
- 20 min in 0,75 % BSA in PBS spülen

Anschließend folgte die einstündige Inkubation mit einem monoklonalen GAP-43-Antikörper (Maus 1:400) in 0,75 % BSA. Nach Spülen mit PBS (dreimal für 10 min) wurden die Schnitte mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (1:100) (Kaninchen-Antimaus) in Rattenserum/PBS (1+9) für 30 min inkubiert, gewaschen und vor der Behandlung mit Diaminobenzidin (DAB) mit dem Ziege anti-Kaninchen-IgG (1:200, 30 min) in Rattenserum/PBS (1+9) gefärbt.

Nach Einbettung in Aquatek® wurden die N. ischiadicus-Schnitte mit Hilfe eines Zeiss Axioplan-Mikroskops zur Dokumentation auf Kodak TMX 100 Film fotografiert.

2.3.2.2 Myelinscheidenfärbung

Zur Quantifizierung der neuronalen Regeneration wurden die Myelinscheiden der Querschnitte vom N. ischiadicus 10 mm distal zur Quetschläsion mit Paraphenylendiamin (Methode nach *Estable-Puig et al., 1965*) gefärbt.

Dabei wurden Übersichtsbilder in 1000-facher Vergrößerung (Ölimmersion) im Lichtmikroskop der folgenden Gruppe erstellt:

- ANG II 10⁻¹¹mol/l
- PD 123319 10⁻⁷mol/l + ANG II 10⁻¹¹mol/l
- Losartan 10⁻⁷mol/l + ANG II 10⁻¹¹mol/l
- Kochsalzkontrolle

An diesen Querschnitten erfolgte zusätzlich die morphometrische Analyse.

2.3.2.3 Elektronenmikroskopische Analyse

Ultradünne (0,5µm) Querschnitte der Angiotensin II (10^{-11} M)-Gruppe wurden nach 10-tägiger bzw. 21-tägiger Behandlungsdauer mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt und unter einem Zeiss 902 Elektronenmikroskop untersucht. Diese Analyse diente zur Dokumentation und internen Kontrolle der durch Paraphenylendiamin durchgeführten Myelinscheidenfärbung

2.3.2.4 Morphometrische Analyse der lichtmikroskopischen Bilder

Die morphometrische Analyse erfolgte im axonalen Bereich 10 mm distal zur Quetschläsion vom N. ischiadicus nach 21 Tagen. Die Auswertung wurden an den mit Paraphenylendiamin-gefärbten Präparaten vorgenommen. Zur Quantifizierung dienten folgende zwei Parameter:

1. Axonkaliber
2. Fläche der Myelinschicht / Myelinisierungsgrad

Zur Bestimmung dieser morphometrischen Parameter stand eine computergestützte Meßeinheit zur Verfügung (Leica-Videokamera, Axio Vision Software). Die Schnittpräparate wurden im Projektionsmikroskop (Zeiss Axiophot Mikroskop) im direkten Licht bei 63-facher Vergrößerung eingescannt (Zeiss Axiocam). Dann digitalisierte die Software (Pentium PC, Image Analysis Software Analysis, Göttingen) nach entsprechender Kalibrierung und Binarisierung die mit Paraphenylendiamin-gefärbten Myelinscheiden und stellte sie als rote Ringe in Computerbild dar. Es wurden zwei unterschiedliche, zufällig ausgewählte Bereiche pro Nervenquerschnitt vermessen. Per Computeranalyse wurden die Daten für den Axonkaliber und die Fläche der Myelinschicht erhoben, die Mittelwerte aus den zwei Messungen bestimmt und abschließend der Mittelwert der jeweiligen Gruppe bestimmt.

2.4 Materialien und Geräte

2.4.1 Chemikalien und Immunhistochemie

- Antiserum 9225, P. Admiral, Amsterdam, NL
- Araldit, Ciba GmbH, Basel, Schweiz
- Bleicitrat, Serva, Heidelberg
- DAB-Substrat-Kit, Vector SK 4100, Burlingame, CA, USA
- Englandstandard, National Institute for Biological Standards and Control, London, GB
- GAP-43 Antikörper, Sigma, München
- 125 I-markiertes ANG II, Amersham-Buchler, Braunschweig
- Losartan, Dr. R. Smith, DuPont Merck, Pharmaceutical Company, Wilmington, USA
- PD 123319, Dr. R. Taylor, Parke Davis, Ann Arbor, Michigan, USA

- Peroxidase-gekoppelter Drittantikörper (Ziege-anti-Kaninchen), DAKO, Glostrup, Dänemark
- Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper (Kaninchen-anti-Maus), DAKO, Glostrup, Dänemark
- Uranylacetat, Serva, Heidelberg

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wiesen molekularbiologische Reinheitsgrade auf und wurden von Sigma Chemikalien Co. (München) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

2.4.2 Tierexperimente

- Nähte, Ethicon 9-0, Ethicon, Norderstedt
- Operationsinstrumente, Dosch GmbH, Heidelberg
- Osmotische Minipumpen (Alzet Modell 2002, 2004), Charles River Wiga, Sulzfeld
- Polyethylenschläuche verschiedener Durchmesser (1,14mm; 1,57mm), Clay Adams, Parsippany, NJ, USA
- Sprague-Dawley Ratten, Charles-River Wiga, Sulzfeld

2.4.3 Geräte

- Axiophot Mikroskop, Zeiss, Jena
- Dosierpumpe (FE 213), Braun, Melsungen
- Gamma-Counter, Berthold, Bad Wildbad
- Image Analysis Software Analysis, Göttingen
- Jung Frigocut 2800 E, Leica, Bensheim
- Mikroskop Leica DMR, Leica
- Morphometrie-Software, Axio Vision, Leica
- RIA-Röhrchen aus Polyacryl, Hormuth GmbH, Heidelberg
- Schockquelle 540V mit einem Standardserienwiderstand von 390 kOhm, Eigenbau
- TMX 100 Film, Kodak, Fotohandel in Kiel
- TK-C 1380 Color Video Camera, Zeiss, Jena
- Zeiss 902 Elektronenmikroskop, Zeiss, Jena

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Evaluation aller gemessenen Parameter erfolgte über eine einseitige Varianzanalyse mit wiederholten Messungen (ANOVA). Ergaben sich Differenzen bei den Mittelwerten innerhalb eines Meßparameters zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen, wurden die Gruppen mit Hilfe des post-hoc Student's t-Test verglichen und mit $p < 0.05$ als signifikant betrachtet. Für den Vergleich der kategorischen Daten der Reflexantwort auf Elektrostimulation wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Alle in den Diagrammen und Tabellen repräsentierten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler vom Mittelwert (mean \pm SEM) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Experimentelles Modell zur lokalen Wirkstoffapplikation

Zur Untersuchung, in wieweit neurotrophe Faktoren einen Einfluß auf die Nervenregeneration zeigen, mußte zunächst ein geeignetes Modell etabliert werden, wobei die unter 2.1.2 *Experimentelles Modell* genannten Faktoren berücksichtigt werden mussten.

Die Möglichkeit zur axonalen Regeneration war durch eine Quetschläsion des N. ischiadicus gegeben. Eine konstante Wirkstoffapplikation über einen bestimmten Zeitraum wurde durch den Einsatz einer osmotischen Minipumpe gewährleistet. Der Katheter wurde ausreichend im Muskel fixiert, so dass durch die Bewegung des Tieres kein Verrutschen festgestellt werden konnte. Mit der Zeit entwickelte sich eine fibröse Hülle um das Katheterende, welche diesen zusätzlich in Position hielt.

Der Katheter hatte keinen direkten Kontakt mit dem Nerven. Regenerationseinschränkungen oder Algesien wurden somit ausgeschlossen. Bei keinem Tier wurden Anzeichen einer Entzündung festgestellt.

Weitere Parameter werden unter den betreffenden Unterpunkten besprochen.

Da in den folgenden Gruppen PD 10^{-7} mol/l, Losartan 10^{-7} mol/l + ANG II 10^{-11} mol/l und PD 10^{-7} mol/l + ANG II 10^{-11} mol/l jeweils 1 Tier und in den Gruppen ANG II 10^{-7} , 10^{-9} mol/l je zwei Tiere postoperativ trophische Ulzera an den Hinterläufen des gequetschten N. ischiadicus entwickelten, werden diese aus dem Protokoll ausgeschlossen. Die Ulzera indizieren einen Sensitivitätsverlust im betroffenen Hinterfuß. Die Tiere hatten sich daraufhin während der experimentellen Periode 1-3 Zehen amputiert.

3.1.1 Pumpleistung

Da ANG II ein Peptid ist, besteht die Möglichkeit, daß dieses an den Pumpeninnenwänden bzw. am Katheter aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen adhäreren kann. Um ein solches Phänomen auszuschließen wurde der Pumpeninhalte einer definierten ANG II-Lösung während einer 20-tägigen Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung bei 37°C in einem Eppendorfgeläß aufgefangen. Das System wurde hermetisch abgedichtet.

Die Pumpen wurde mit einer ANG II-Lösung 10^{-11} mol/l befüllt. Bei einem Füllungsvolumen von 243 µl und angegebener Konzentration der Lösung waren 2,43 pg ANG II enthalten.

Der Radioimmuno-Assay bestimmte eine Menge von $2,4 \pm 0,12$ pg ANG II in der aufgefangenen Pumpflüssigkeit und bestätigte damit, daß kein ANG II aufgrund von

Anhaftung an Innenwänden verloren geht. Dies Ergebnis unterstreicht ebenfalls, daß ANG II bei einer Lagerung bei 37 °C stabil bleibt und sich nicht zersetzt.

3.1.2 ANG II-Stabilität bei Körpertemperatur

Zur Klärung der Frage, ob ANG II in diesem Modell bei Körpertemperatur den Versuchszeitraum überdauernd stabil ist, wurden 3 Eppendorfgefäße mit der entsprechenden Lösung (500 pg/50 µl) über 16 Tage im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Täglich wurden aus jedem Gefäß zwei Proben à 100 µl entnommen und bei -20 °C tiefgefroren. Am Ende der Versuchsdauer wurden die Konzentrationen mit Hilfe des Radioimmuno-Assays bestimmt.

Es zeigte sich, dass kein Verlust von ANG II durch Zersetzung oder Anhaftung an der Gefäßinnenwand feststellbar war.

Die Konzentration der jeweilig entnommenen Proben blieb über den gesamten Zeitraum hinweg relativ konstant. Der zeitliche Verlauf ist in Abbildung 7 dargestellt.

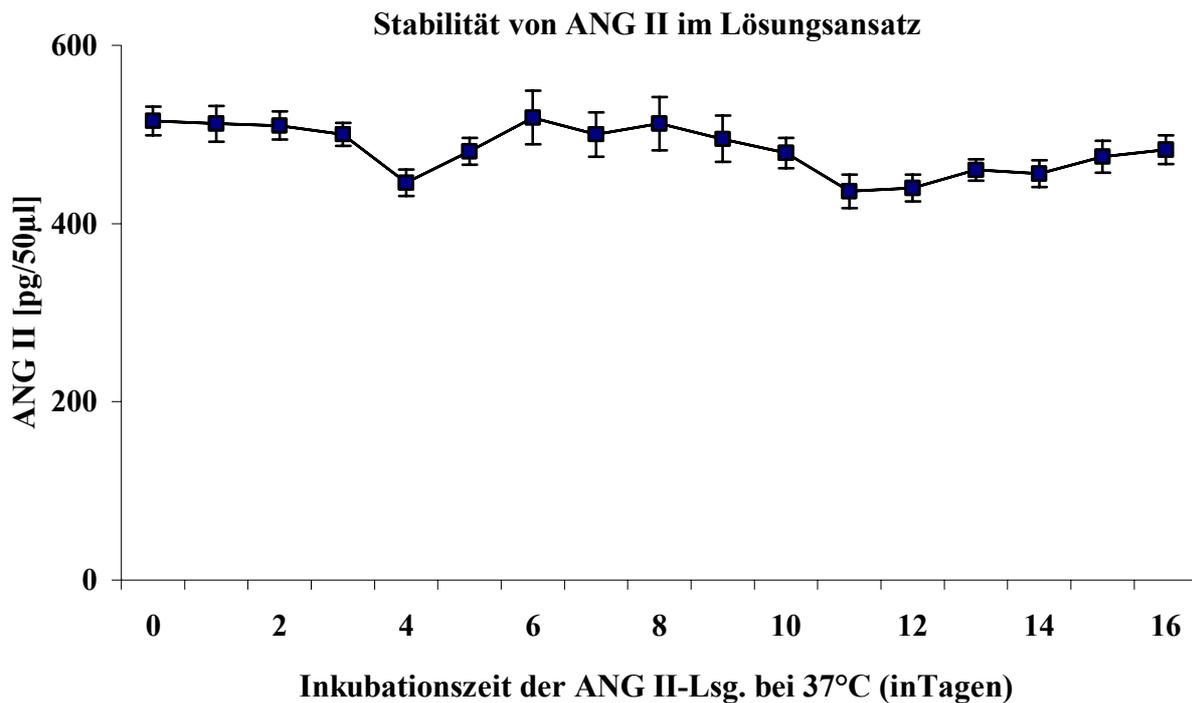


Abbildung 7: Stabilität der ANG II-Lösung (500pg/50µl) über einen Zeitraum von 16 Tagen bei 37 °C. Dargestellt sind die Ergebnisse der täglichen Probenentnahme analysiert mittels RIA. (Mittelwert \pm SEM).

3.2 In vivo Regenerationsverlauf

Die funktionelle Regeneration des N. ischiadicus wurde mit Hilfe der Fußspannenanalyse und Elektrostimulation quantifiziert. Beide Analysemethoden repräsentieren einen zuverlässigen und reproduzierbaren Index zur Bestimmung der funktionellen Regeneration. Zur Validierung wurden beiden Methoden jeweils bei allen Tieren durchgeführt.

3.2.1 Fußspannenanalyse

Die Fußabdrücke wurden analysiert, indem die Abstand zwischen dem 2. und 4. Zeh bestimmt wurde. Alle Tiere zeigten eine komplette schlaffe Paralyse mit Verlust des Muskeltonus im operierten Fuß infolge der Nervenquetschung. Bei allen Tieren konnten Anzeichen funktioneller Regeneration bis zum Studienende von 21 Tagen festgestellt werden. Die Spannen der nicht operierten Tiere, die vor der Quetschung erhoben wurden, differierten nicht. In normalen, nicht operierten Kontrolltieren betrug die Fußspanne zwischen dem 2. und 4. Zeh 11,5 mm bis 12 mm. Bei den operierten Tieren kommt es zunächst infolge der Quetschläsion des N. ischiadicus zu einer schlaffen Lähmung. Die Tiere können anfangs den verletzten Fuß nicht zum Gehen einsetzen und ziehen diesen nach. Mit einsetzender Regeneration des gequetschten Nerven, sind die Ratten immer mehr in der Lage, eine Abrollbewegung mit dem betroffenen Hinterfuß durchzuführen. Der verbesserte Abrolldruck spiegelt sich in einer vergrößerten Fußspanne wieder. Der N. ischiadicus ist mit seinem tibialen Zweig für das Ausmaß dieser Fußspanne verantwortlich. Die Tiere zeigten keine Seitenunterschiede in der Fußspanne. Zur Erhebung der Daten wurden jedes Mal die Spanne des linken Hinterfußes zu Grunde gelegt.

ANG II zeigte einen positiven Einfluß auf die Nervenregeneration abhängig von der gewählten Konzentration. Repräsentative Fußabdrücke im Vergleich zeigt Abbildung 8.

Diese Bilder wurden durch Einscannen des originalen Fußabdrucks mittels eines Flachbrett-Auflicht-Scanners (Deskscan II Hewlett Packard) erstellt. Alle Tiere zeigen Zeichen einer Regeneration, da ihre Fußabdrücke die Fähigkeit zum Gehen aufzeigen. Das Erscheinungsbild der Fußabdrücke der mit ANG II allein oder in Kombination mit AT₁-Antagonisten Losartan behandelten Tiere ist nahe dem normalen: alle 5 Zehen sind deutlich zu erkennen, die Fußspanne ist weit gespreizt, und es zeigt sich kein Abdruck der Ferse. Dies alles reflektiert die Fähigkeit der Tiere, auf ihrem Fußballen und Zehen zu laufen. Die Abdrücke der anderen Gruppen zeigt eine geringere Spannweite und Fähigkeit zum Laufen.

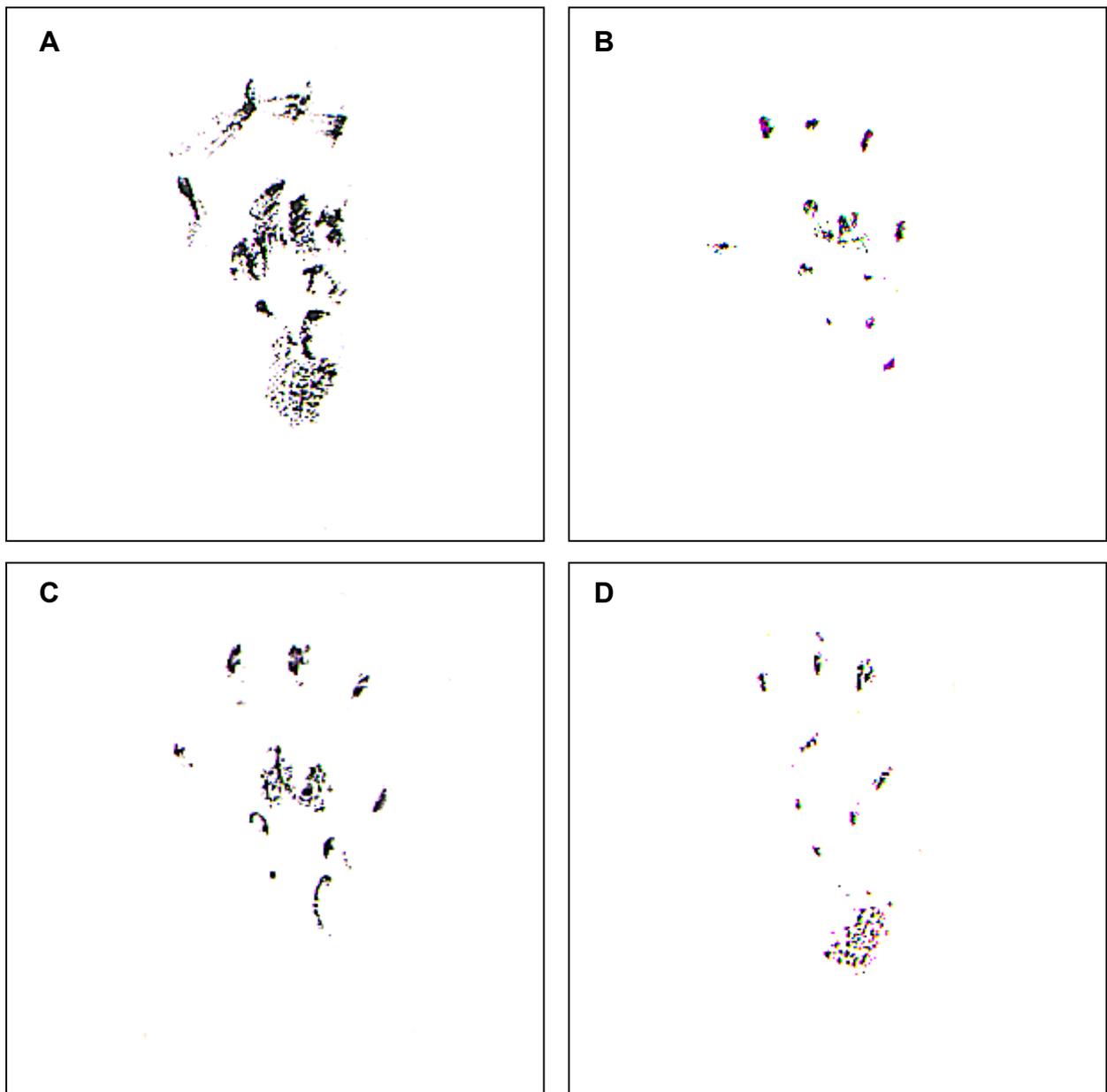


Abbildung 8: Repräsentative Fußabdrücke 20 Tage nach Nervenquetschung der Tiere, die kontinuierlich mit Kochsalz-Lösung (Bild A) oder ANG II (10^{-11} mol/l)-Lösung (Bild B), der Kombination von ANG II (10^{-11} mol/l) mit dem AT_1 -Rezeptor-Antagonisten Losartan (10^{-7} mol/l) (Bild C) bzw. mit dem AT_2 -Rezeptor-Antagonisten PD 123319 (10^{-7} mol/l) (Bild D) behandelt wurden.

3.2.1.1 Konzentrationsabhängige Beeinflussung durch ANG II

Die Dosis-Wirkungskurve (Abbildung 9) zeigt, daß die Tiere, die mit einer Konzentration von 10^{-11} mol/l ANG II behandelt wurden, die größte Fußspanne aufwiesen ($10,21 \pm 0,27$ mm; $p < 0,001$ vs. Kochsalzkontrolle). Auch durch eine lokale Behandlung mit ANG II (10^{-9} mol/l) konnte eine signifikant vergrößerte Fußspanne gemessen werden ($9,85 \pm 0,22$ mm, $p < 0,05$ vs. Kochsalzkontrolle). Die geringste Fußspanne zeigte die mit 10^{-7} mol/l ANG II behandelte Gruppe. Ebenfalls auf diesem Niveau war die mit physiologischer Kochsalz-Lösung behandelte Negativkontrolle angesiedelt ($8,73 \pm 0,16$ mm). Es handelt sich somit um eine inverse Dosisabhängigkeit. Für die als Positivkontrolle fungierende NGF-Gruppe wurde eine Zehenspanne von $9,79 \pm 0,34$ mm ($p < 0,05$ vs. Kochsalzkontrolle) gemessen.

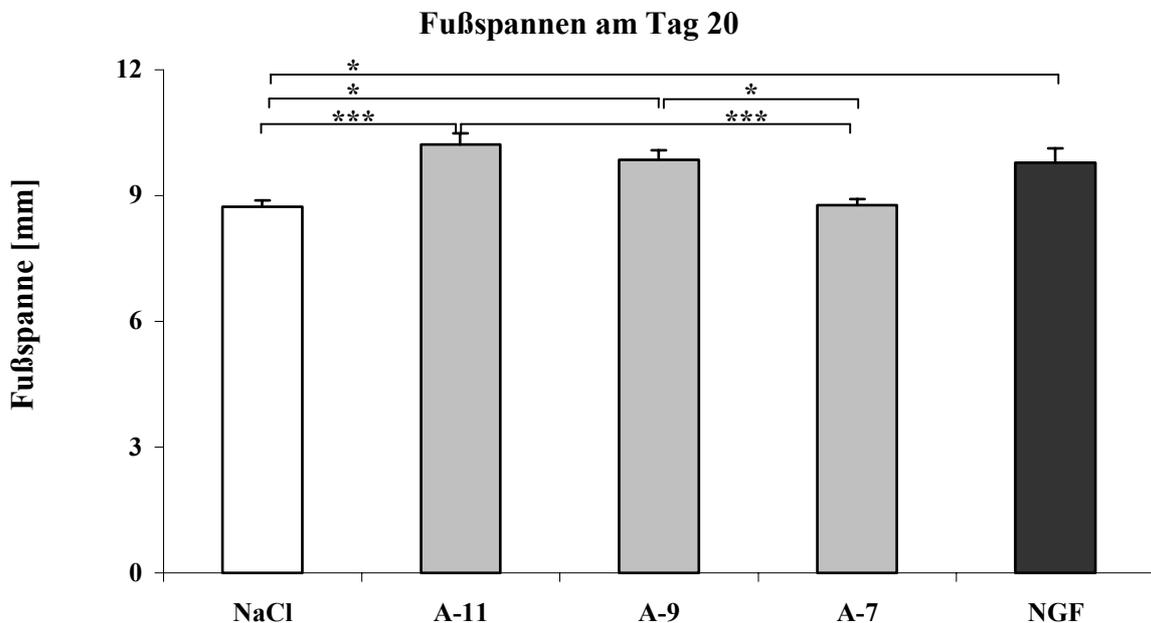


Abbildung 9: Fußspannen am Tag 20 infolge Quetschläsion. Dargestellt sind die Mittelwerte der erhobenen 2-4-Fußspannen der Gruppen, die mit Kochsalz-Lösung (NaCl), ANG II-Lösung der Konzentration 10^{-11} mol/l (A-11), 10^{-9} mol/l (A-9), 10^{-7} mol/l (A-7) und NGF-Lösung (NGF) behandelt wurden. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. Kochsalzkontrolle.

Um die jeweilige Funktion der Rezeptorsubtypen, AT_1 und AT_2 , bei der Nervenregeneration voneinander differenzieren zu können, wurde der Einfluß der spezifischen ANG II-Rezeptorliganden, Losartan und PD 123319, auf die ANG II-induzierte Regenerationsbeschleunigung nach Quetschung des N. ischiadicus untersucht.

Hierzu wurden 2 Versuchsansätze gewählt:

1. Zur Untersuchung des Einflusses von exogen appliziertem ANG II wurden die Tiere mit einer Kombination von ANG II mit den selektiven ANG II-Rezeptor-Antagonisten behandelt.
2. Zur Untersuchung des Einflusses des endogenen RAS wurden die Tiere ausschließlich mit den selektiven ANG II-Rezeptor-Antagonisten behandelt.

3.2.1.2 Rezeptoranalyse bei exogen-appliziertem ANG II

Der AT₁-Rezeptor-Antagonist Losartan (10^{-7} mol/l) in Kombination mit ANG II (10^{-11} mol/l) vermochte die ANG II-induzierte Regenerationsbeschleunigung nicht zu inhibieren. Die Gruppe zeigte eine Fußspanne von $10,92 \pm 0,51$ mm ($p < 0,001$ vs. Kochsalzkontrolle).

Dagegen hob der AT₂-Rezeptor-Antagonist PD 123319 (10^{-7} mol/l) in Kombination mit ANG II (10^{-11} mol/l) den wachstumsfördernden Effekt von ANG II vollständig auf ($8,98 \pm 0,35$ mm). Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

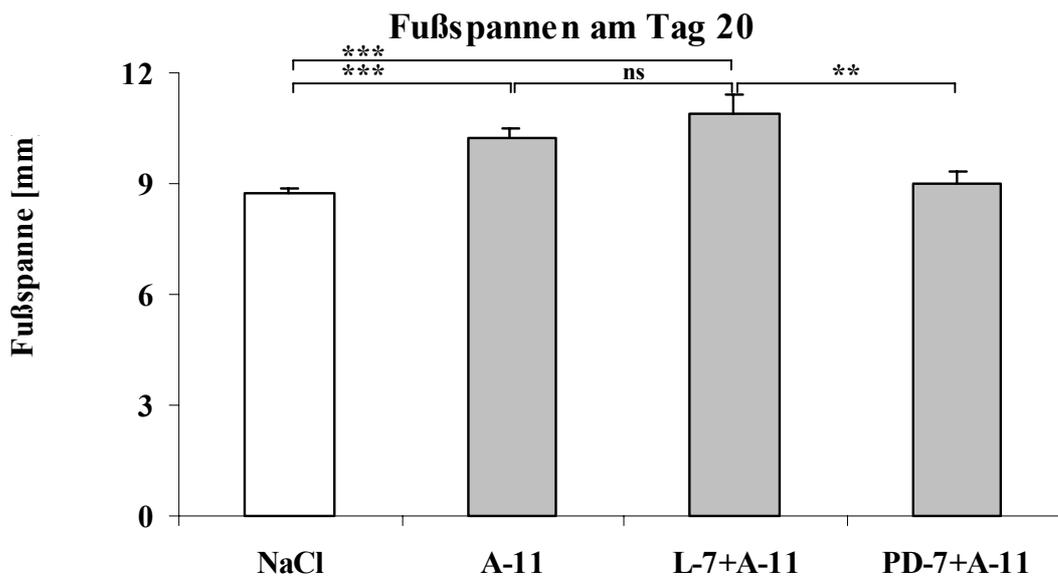


Abbildung 10: Fußspannen am Tag 20 infolge der Quetschläsion. Dargestellt sind die Mittelwerte der erhobenen 2-4-Fußspannen der Gruppen, die mit Kochsalz-Lösung (NaCl), ANG II-Lösung der Konzentration 10^{-11} mol/l (A-11), Kombination von Losartan (10^{-7} mol/l) plus ANG II (10^{-11} mol/l) (L-7+A-11) bzw. PD 123319 (10^{-7} mol/l) plus ANG II (10^{-11} mol/l) (PD-7+A-11) behandelt wurden. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Kochsalzkontrolle.

3.2.1.3 Endogenes ANG II

Die Behandlung mit Losartan (10^{-7} mol/l) zeigte eine vergrößerte Fußspanne ($10,29 \pm 0,24$ mm; $p < 0,001$ vs. Kochsalzkontrolle), während der AT_2 -Rezeptor-Antagonist PD 123319 (10^{-7} mol/l) die ANG II-induzierte Regenerationsbeschleunigung vollständig hemmte ($8,85 \pm 0,30$ mm).

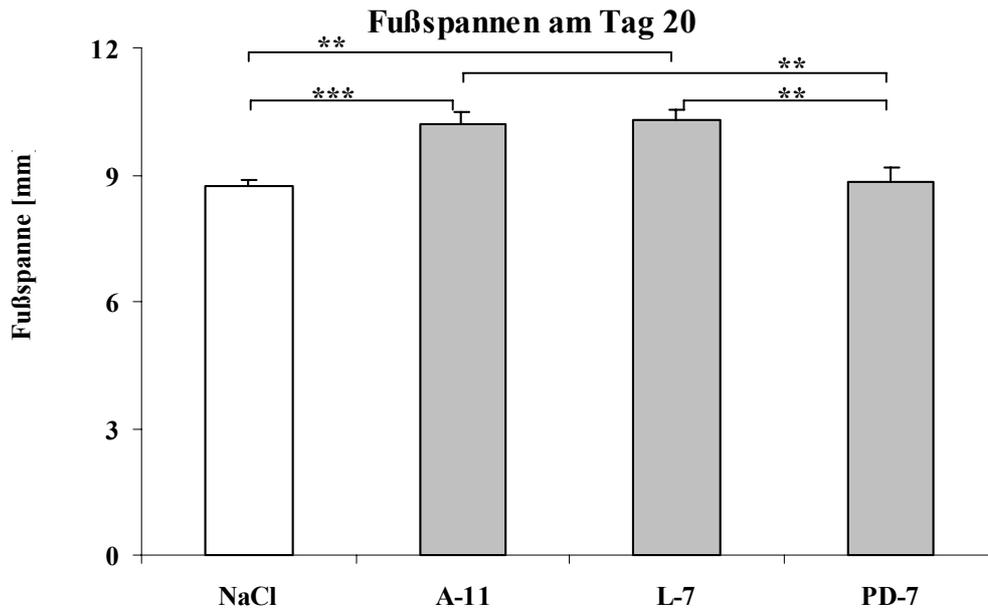


Abbildung 11: Fußspannen am Tag 20 infolge der Quetschläsion. Dargestellt sind die Mittelwerte der erhobenen 2-4-Fußspannen der Gruppen, die mit Kochsalz-Lösung (NaCl), ANG II-Lösung der Konzentration 10^{-11} mol/l (A-11), Losartan (10^{-7} mol/l) (L-7) bzw. PD 123319 (10^{-7} mol/l) (PD-7) behandelt wurden. $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ vs. Kochsalzkontrolle.

3.2.1.4 Kombinierte Blockade von AT_1 - und AT_2 -Rezeptoren

Um eine vollständige Blockade beider AT-Rezeptoren zu erzielen, wurden die Tiere mit einer Kombination aus Losartan und PD 123319 (10^{-7} mol/l, jeweils) mit ANG II (10^{-11} mol/l) behandelt. Es wurde eine komplette Inhibition der ANG II-induzierten Regeneration festgestellt. Für die Fußspanne ergab sich ein Wert von $8,58 \pm 0,21$ mm vs. $8,73 \pm 0,16$ mm in der Kochsalz-Kontrollgruppe.

3.2.1.5 Einfluss einer zeitlich verlängerten ANG II-Applikation

Der verlängerte Behandlungs- und Beobachtungszeitraum (*Abbildung 12*) zeigt nach 30 Tagen für die ANG II- und Kochsalzbehandlung gleiche Werte in der Fußspannenanalyse. Beide Gruppen unterscheiden sich nicht mehr signifikant von gesunden Tieren und zeigen auch innerhalb der nächsten zwei Tage keine weitere Regenerationsverbesserung.

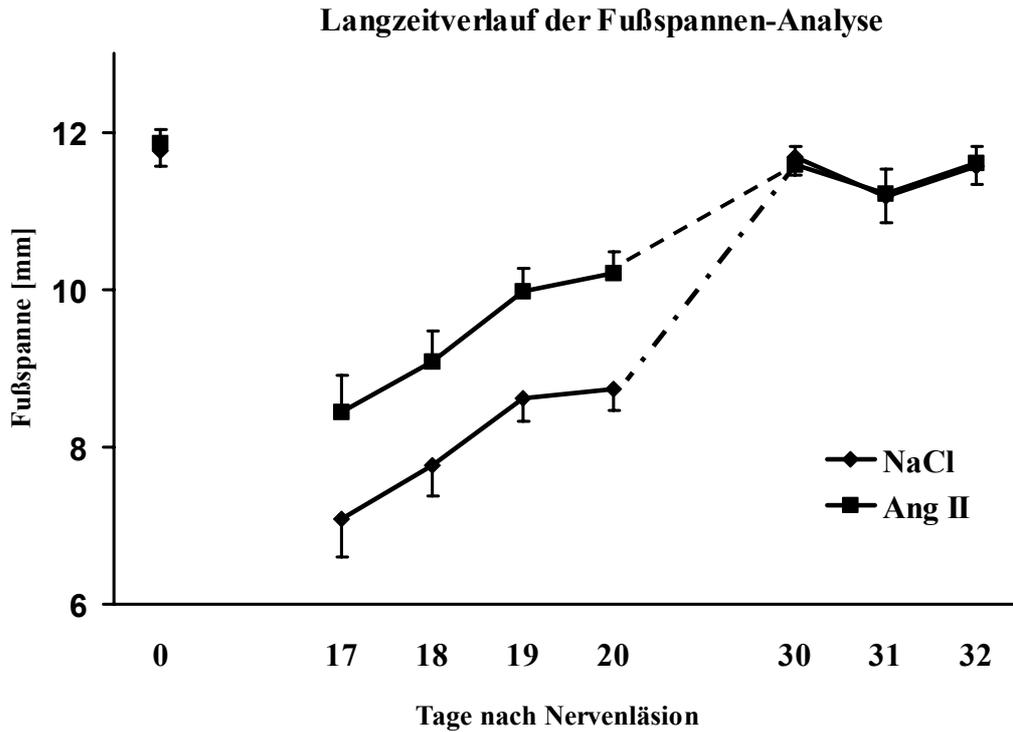


Abbildung 12: Langzeitverlauf der Fußspannen-Analyse über 32 Tage. Dargestellt sind die Ergebnisse der Fußspannen-Analyse beginnend mit Tag 17 für die Kochsalzkontrolle und die ANG II (10^{-11} mol/l)-Gruppe.

3.2.2 Sensomotorische Funktion nach Elektrostimulation

3.2.2.1 Konzentrationsabhängige Beeinflussung durch ANG II

Wie schon anhand der Fußspannenanalyse gezeigt, vermochte die Behandlung mit ANG II der Konzentration (10^{-11} mol/l) ebenso die Nervenregeneration am besten zu beschleunigen. Die Antwort auf die lokale Elektrostimulation reduzierte sich auf $14,6 \pm 0,64$ Tage vs. $17,9 \pm 0,37$ Tagen in der Kochsalz-Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Für die beiden anderen ANG II-Konzentrationen (10^{-7} mol/l und 10^{-9} mol/l) konnte keine beschleunigte sensomotorische Funktion festgestellt werden. Die ANG II-Konzentration von 10^{-7} mol/l zeigte sogar ein signifikant verschlechtertes Ergebnis gegenüber der Kochsalzkontrolle ($20,15 \pm 0,34$ Tage, $p < 0,05$ vs. Kochsalzkontrolle).

Die Positivkontrolle mit NGF führte ebenfalls zu einem signifikant beschleunigten Reflex auf die Fußsohlenstimulation ($15,56 \pm 0,93$, $p < 0,05$ vs. Kochsalzkontrolle).

Die Abbildung 13 zeigt die Mittelwerte bis zum positiven Reflex der einzelnen Gruppen.

Der Zeitverlauf bis zur Rückkehr der sensomotorischen Funktion ist in Abbildung 14 wiedergegeben.

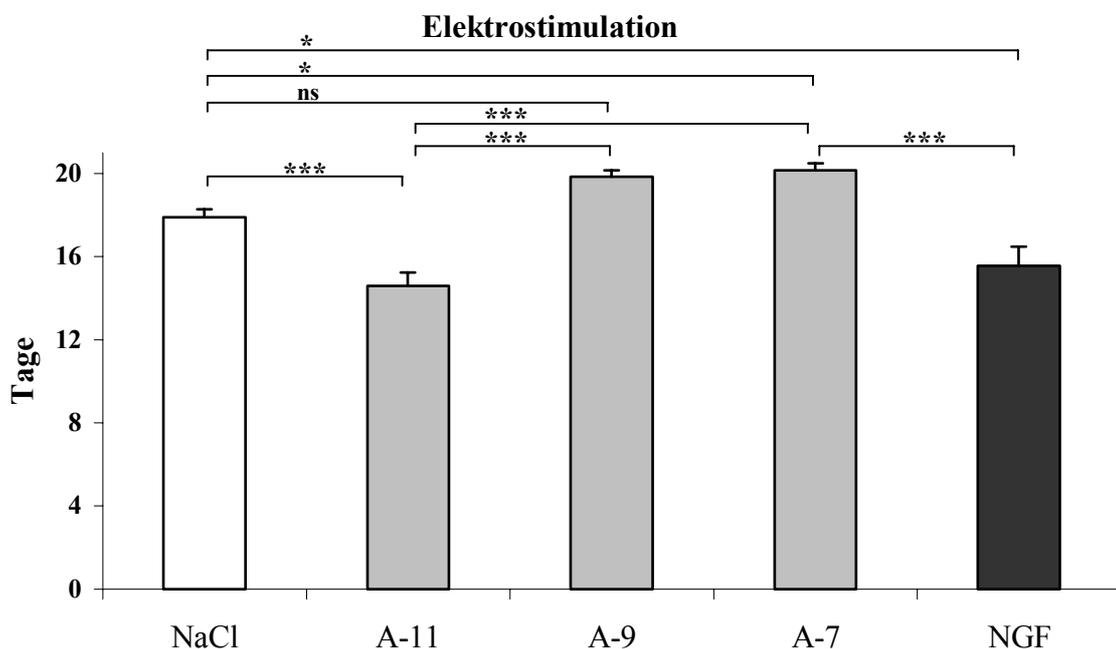


Abbildung 13: Rückkehr der sensomotorischen Funktion. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tage post laesionem, an denen der Elektrostimulationstest positiv wurde. Minipumpen mit Kochsalz-Lösung (NaCl), ANG II-Lösung der Konzentration 10^{-11} mol/l (A-11), 10^{-9} mol/l (A-9), 10^{-7} mol/l (A-7) und NGF-Lösung (NGF). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. Kochsalz-Lösung.

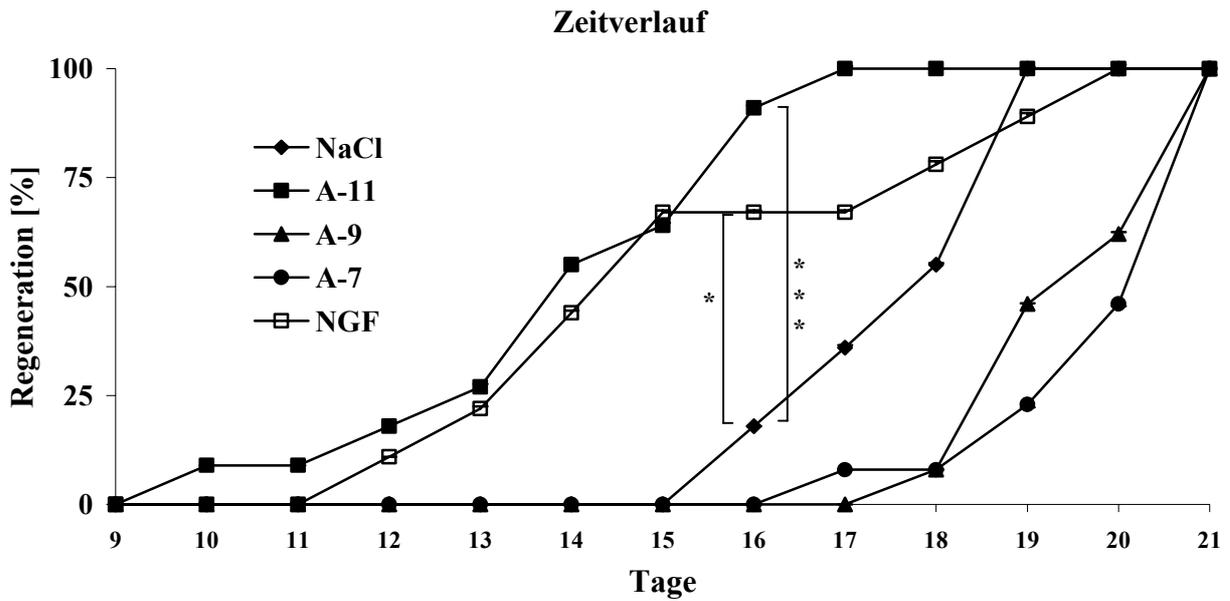


Abbildung 14: Zeitverlauf der Rückkehr der sensomotorischen Funktion. Die Daten der sensomotorischen Funktion sind dargestellt als prozentualer Anteil der Versuchsgruppe, der am jeweiligen Tag eine positive Reaktion auf den Elektrostimulationstest zeigte. Minipumpen mit Kochsalz-Lösung (NaCl), ANG II-Lösung der Konzentration 10^{-11} mol/l (A-11), 10^{-9} mol/l (A-9), 10^{-7} mol/l (A-7) und NGF-Lösung (NGF).

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. Kochsalz-Lösung.

3.2.2.2 Rezeptoranalyse bei exogen appliziertem ANG II

Der AT_1 -Rezeptor-Antagonist Losartan (10^{-7} mol/l) in Kombination mit ANG II (10^{-11} mol/l) vermochte die ANG II-induzierte Regenerationsbeschleunigung nicht zu inhibieren (Abbildung 15). Diese Behandlung resultierte in einem signifikant früheren positiven Fußreflex ($p < 0,01$ vs. Kochsalzkontrolle).

Dagegen hob der AT_2 -Rezeptor-Antagonist PD 123319 (10^{-7} mol/l) in Kombination mit ANG II (10^{-11} mol/l) den regenerationsfördernden Effekt von ANG II vollständig auf. Die mit PD 123319 behandelten Ratten antworteten auf den Elektrostimulus ähnlich der Kochsalz-Kontrollgruppe (18,56 Tage vs. 17,91 Tage).

Ein Gegenüberstellung der Gruppen im Zeitverlauf ist in Abbildung 16 gezeigt.

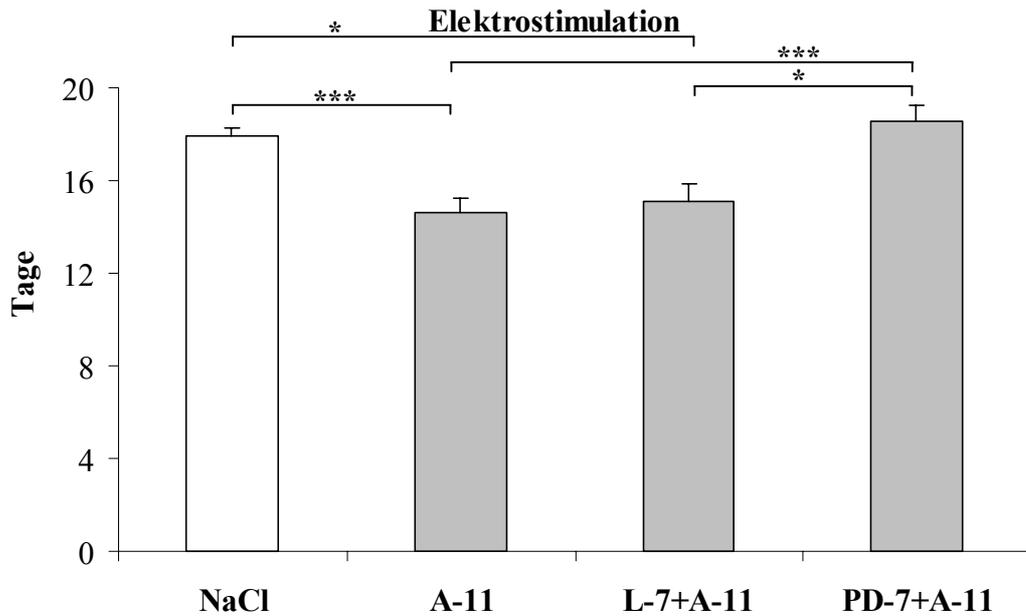


Abbildung 15: Rückkehr der sensomotorischen Funktion. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tage post laesionem, an denen der Elektrostimulationstest positiv wurde. Minipumpe mit Kochsalz-Lösung (NaCl), ANG II-Lösung der Konzentration 10^{-11} mol/l (A-11), Kombination von Losartan (10^{-7} mol/l) plus ANG II (10^{-11} mol/l), (L-7+A-11) bzw. PD 123319 (10^{-7} mol/l) plus ANG II (10^{-11} mol/l), (PD-7+A-11). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. Kochsalz-Lösung.

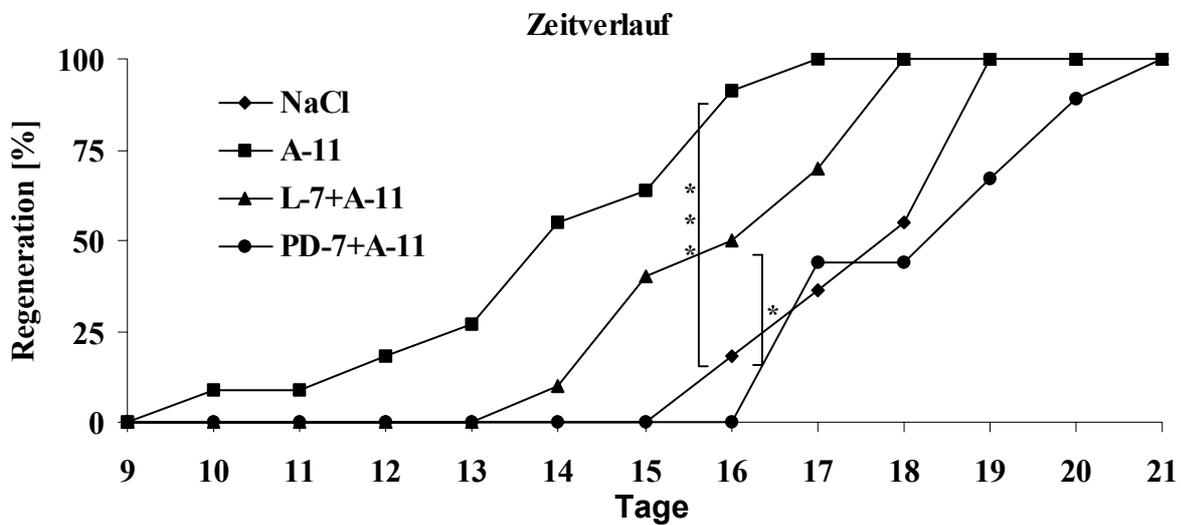


Abbildung 16: Zeitverlauf der Rückkehr der sensomotorischen Funktion. Die Daten der sensomotorischen Funktion sind dargestellt als prozentualer Anteil der Versuchsgruppe, der am jeweiligen Tag eine positive Reaktion auf den Elektrostimulationstest zeigte. Minipumpen mit Kochsalz-Lösung (NaCl), ANG II-Lösung der Konzentration 10^{-11} mol/l (A-11), Kombination von Losartan (10^{-7} mol/l) plus ANG II (10^{-11} mol/l) (L-7+A-11) bzw. PD 123319 (10^{-7} mol/l) plus ANG II (10^{-11} mol/l) (PD-7+A-11). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. Kochsalz-Lösung.

3.2.2.3 Endogenes ANG II

Die Ergebnisse für das endogene RAS, d.h. nach alleiniger Gabe von Losartan oder PD 123 319 korrespondierten mit denen durch exogen appliziertes ANG II ermittelten, d.h. der Kombination aus den jeweiligen Antagonisten plus ANG II (*Abbildung 17*). Die Losartan-Behandlung reduzierte die Antwort auf den Elektrostimulationstest auf 16,3 Tage ($p < 0,05$ vs. Kochsalz-Kontrollgruppe), während PD 123319 behandelte Tiere erst nach 18,6 Tagen auf den Elektrostimulus reagierten. Der Zeitverlauf ist in *Abbildung 18* dargestellt.

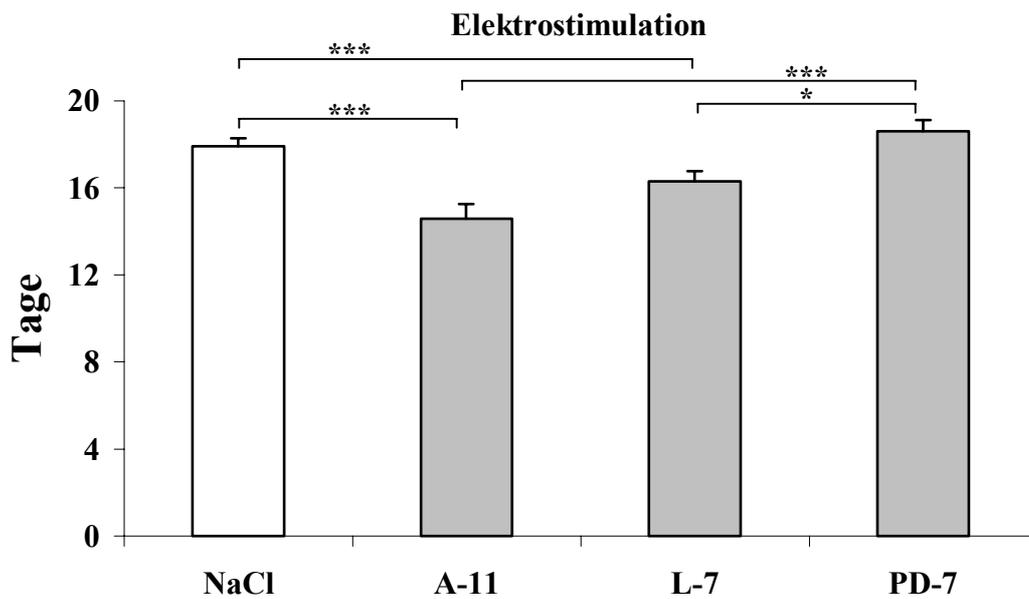


Abbildung 17: Rückkehr der sensomotorischen Funktion. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tage post laesionem, an denen der Elektrostimulationstest positiv wurde. Minipumpe mit Kochsalz-Lösung (NaCl), ANG II-Lösung der Konzentration 10^{-11} mol/l (A-11), Losartan (10^{-7} mol/l) (L-7) bzw. PD 123319 (10^{-7} mol/l) (PD-7). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. Kochsalz-Lösung.

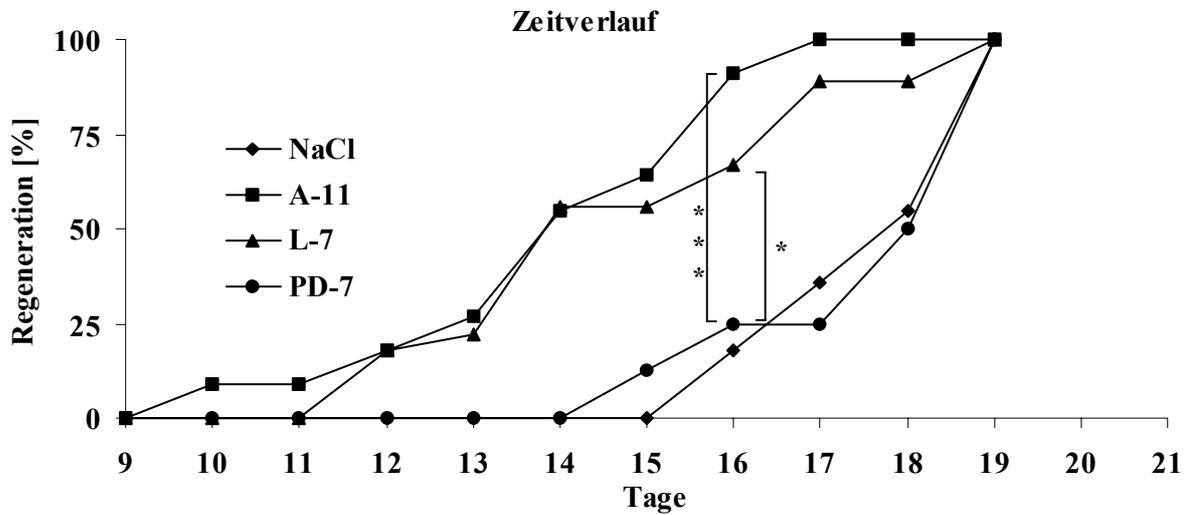


Abbildung 18: Zeitverlauf der Rückkehr der sensomotorischen Funktion Die Daten der sensomotorischen Funktion sind dargestellt als prozentualer Anteil der Versuchsgruppe, der am jeweiligen Tag eine positive Reaktion auf den Elektrostimulationstest zeigte. Minipumpen mit Kochsalz-Lösung (NaCl), ANG II-Lösung der Konzentration 10^{-11} mol/l (A-11), Losartan (10^{-7} mol/l) (L-7) bzw. PD 123319 (10^{-7} mol/l) (PD-7).

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. Kochsalz-Lösung

3.2.2.4 Kombinierte Blockade von AT_1 - und AT_2 -Rezeptoren

Die Kombination beider Antagonisten (10^{-7} mol/l, jeweilig) mit ANG II (10^{-11} mol/l) resultierte ebenfalls in einer zeitlich verzögerten positiven Reaktion auf die Elektrostimulation (18 Tage vs. 17,91 Tage).

3.3 Histologische Auswertung

3.3.1 GAP-43 Färbung

Die Quantifizierung des axonalen Wachstums erfolgte durch immunhistochemische Färbung gegen GAP-43. Dieses Protein wird selektiv in regenerierenden Nervenfasern im präsynaptischen Ende neugeformter neuromuskulärer Verbindungsstellen exprimiert. Die Färbung wurde an 5 µm dicken, von der Läsionsstelle 10 mm in distale Richtung verlaufenden Kryostat-Längsschnitten durchgeführt.

In der Kochsalz-Kontrollgruppe waren nur wenige Fasern GAP-43 positiv. Das axonale Wachstum war jedoch nicht durch die Läsionsstelle begrenzt. Die Behandlung mit ANG II (10^{-11} mol/l) bewirkte eine starke Zunahme der Zahl regenerierender Axonbündel im distalen Nervenstumpf. Diese durch ANG II-induzierte axonale Regeneration wurde durch Co-Behandlung mit dem AT₂-Rezeptor-Antagonisten PD 123319 (10^{-7} mol/l) unterbunden. Es ließen sich deutlich weniger Axone mit GAP-43 detektieren. Der AT₁-Rezeptor-Antagonist Losartan (10^{-7} mol/l) zeigte ein GAP-43-Expressionsmuster vergleichbar dem der ANG II-Behandlung. Lichtmikroskopische Darstellungen der einzelnen Gruppen sind in Abbildung 19 ersichtlich.

Mit dieser Methode ließ sich keine Quantifizierung des axonalen Wachstums erzielen, da die regenerierenden Axone nicht, entgegen dem Verhalten nach zentraler Nervenläsion, ein durch die Quetschstelle begrenztes Wachstum aufwiesen. Eine Längenbestimmung der über die Glianarbe hinauswachsenden Axone war nicht möglich, denn der Wachstumskegel hatte in allen vier Gruppe den gewählten zu untersuchenden Bereich bereits überwunden.

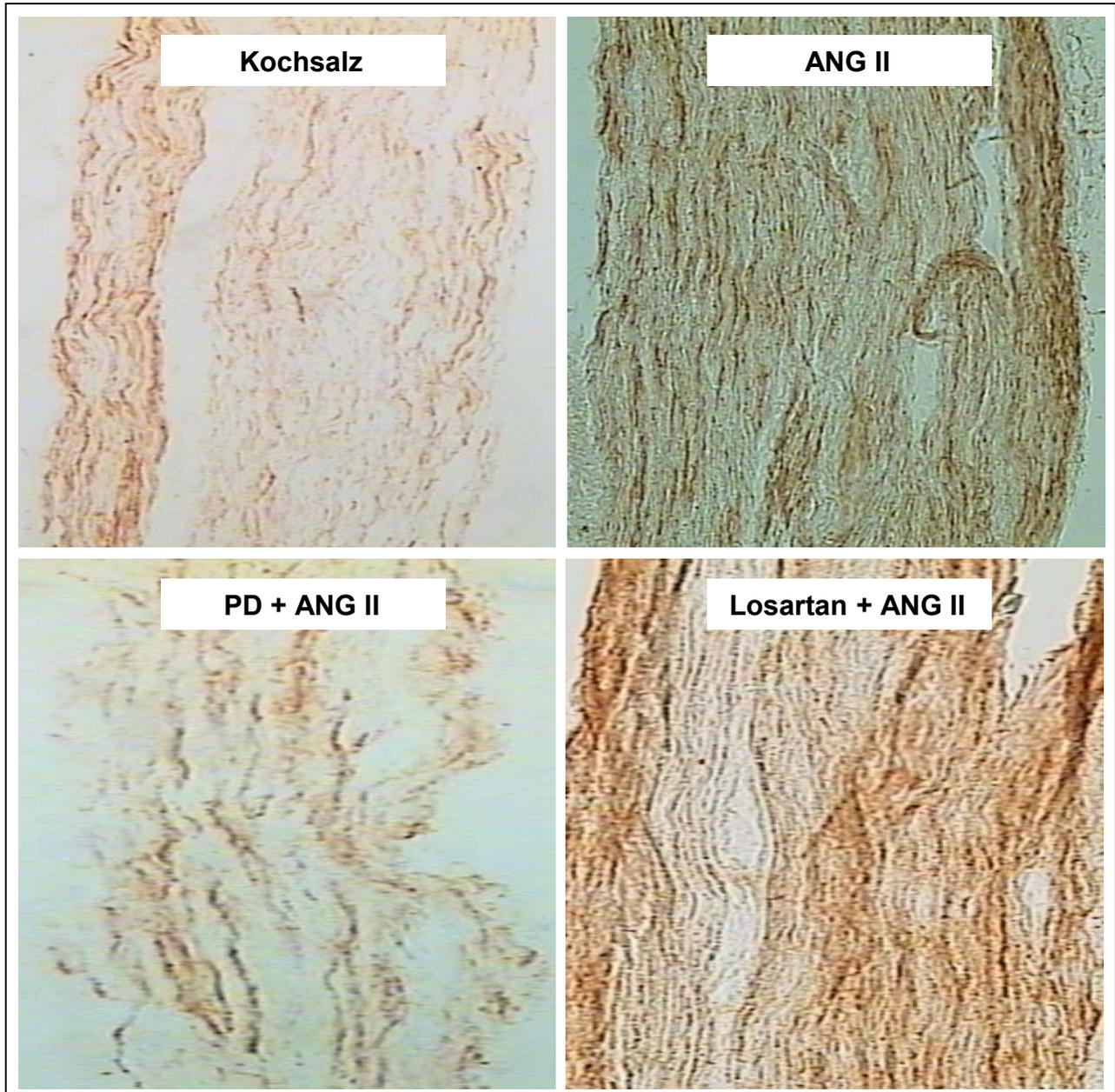


Abbildung 19: Dargestellt sind repräsentative Lichtmikroskopien der mit GAP-43-gefärbten 5 μ m-Schnitte (10 mm distal zur Läsion) 21 Tage nach Quetschläsion. Vergrößerung x 900

3.3.2 Myelinscheidenfärbung

Die Unterschiede in der funktionellen Wiedererlangung der Nervenfunktion nach Quetschung des N. ischiadicus wurden in der morphologischen Untersuchung im Lichtmikroskop nach Anfärbung der Myelinscheiden mit Paraphenylendiamin reflektiert. Zur Erhebung der Daten wurde das Segment 10 mm distal zur Quetschläsion des N. ischiadicus am Tag 21 nach der OP herangezogen.

Repräsentative lichtmikroskopische Darstellungen (*Abbildung 20*) enthüllten deutlich mehr myelinisierte Axone in ANG II- behandelten (10^{-11} mol/l) Gruppen verglichen mit der Kochsalz-Kontrollgruppe. Der positive Effekt von ANG II ließ in der Gegenwart von PD 123319 nach. Der AT_1 -Rezeptor-Antagonist Losartan vermochte diesen Effekt nicht zu inhibieren.

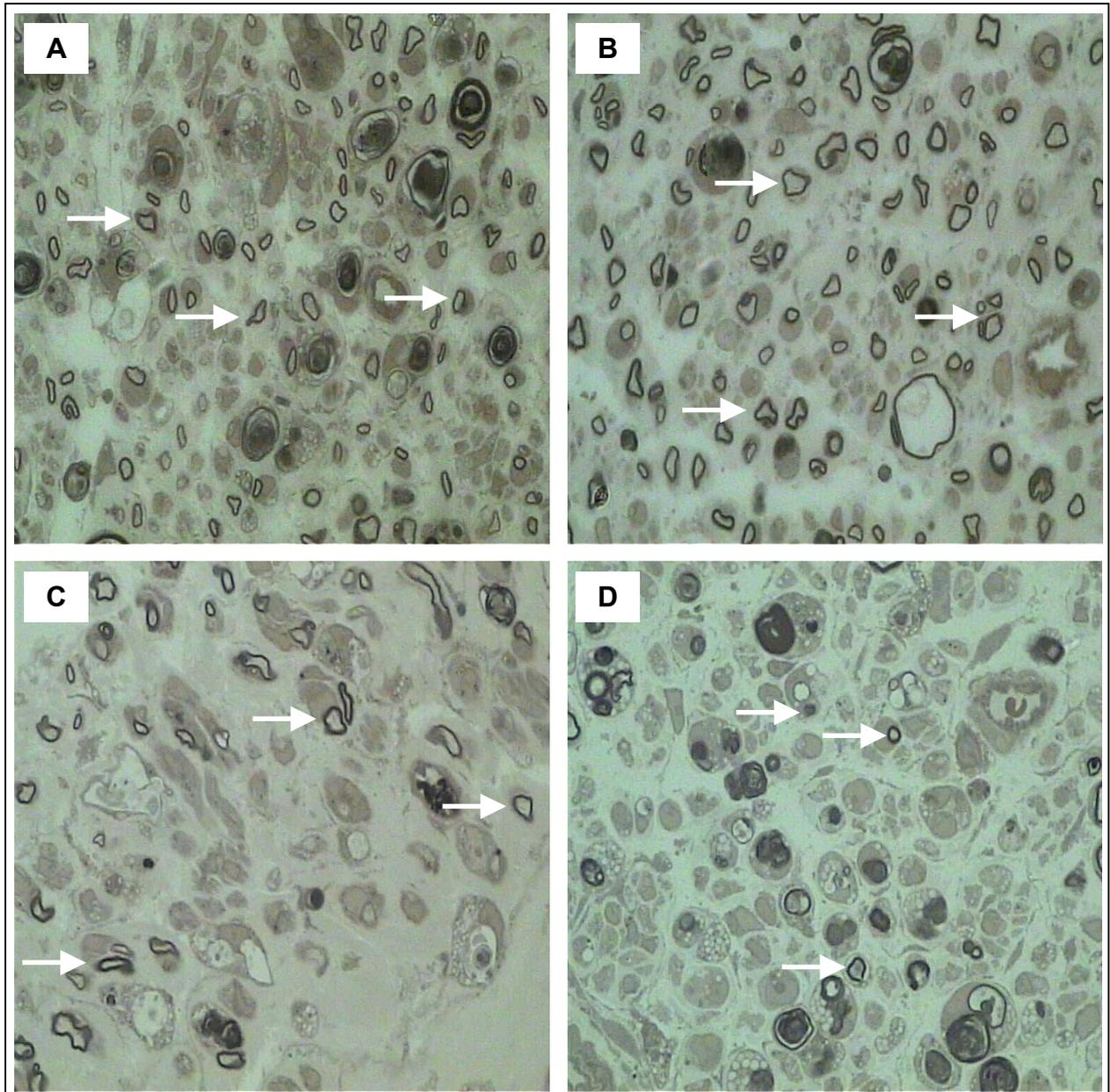


Abbildung 20: Dargestellt sind repräsentative lichtmikroskopische Darstellungen der 1µm-Schnitte des Ischiasnerven 10 mm distal zur Quetschläsion nach 21 Tagen der kontinuierlich Behandlung mit Kochsalz-Lösung (Bild C), ANG II (10^{-11} mol/l) (Bild A), der Kombination des AT_1 -Rezeptor-Antagonisten Losartan (10^{-7} mol/l) mit ANG II (10^{-11} mol/l) (Bild B) oder der Co-Behandlung mit dem AT_2 -Rezeptor-Antagonisten PD 123319 (10^{-7} mol/l) (Bild D). Die Nerven der mit ANG II allein oder in Kombination mit Losartan behandelten Tiere enthielten eine größere Anzahl an regenerierenden myelinisierten Axonen. PD-Färbung, Vergrößerung $\times 1000$.

Myelinisierte Axone wurden beispielhaft in allen Bildern mit weißen Pfeilen gekennzeichnet.

3.3.3 Elektronenmikroskopische Analyse entnommener Nervensegmente

Die elektronenmikroskopische Analyse zeigte eine zeitabhängige Vergrößerung des Axondurchmessers sowie der Anzahl myelinisierter Axone in der mit ANG II (10^{-11} mol/l)-behandelten Gruppe nach 21 Tagen verglichen mit der Situation nach 10 Tagen nach Quetschläsion (*Abbildung 21*).

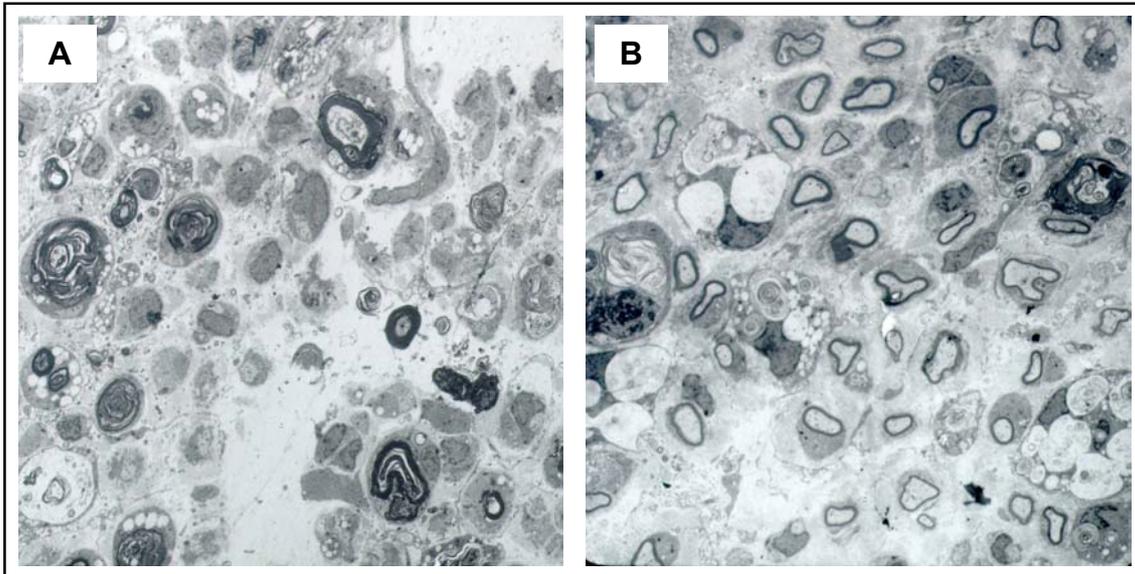


Abbildung 21: Dargestellt sind elektronenmikroskopische Bilder der Axone ANG II (10^{-11} mol/l)-behandelter Tiere 10 Tage (Bild A) und 21 Tage (Bild B) nach Quetschläsion. Axone in der Nerven 21 Tage nach Quetschung erscheinen größer und stärker myelinisiert verglichen mit den Axonen 10 Tage nach Quetschung. Uranylacetat/Bleicitrat-Färbung, Vergrößerung $\times 1500$.

3.3.4 Morphometrische Analyse der lichtmikroskopischen Bilder

Die morphologischen Charakteristika wurden durch eine morphometrische Analyse der axonalen Bereiche im N. ischiadicus 21 Tage nach der Nervenläsion bestätigt. Zur Quantifizierung dienten folgende zwei Parameter:

1. Durchmesser des Axonkalibers
2. Fläche der Myelinschicht / Myelinisierungsgrad

3.3.4.1 Durchmesser der Axonkaliber

In ANG II-behandelten Tieren vergrößerte sich der Durchmesser der Axone signifikant ($p < 0,05$) verglichen mit der Kochsalz-Kontrollgruppe ($4,08 \pm 0,14 \mu\text{m}$ vs. $3,52 \pm 0,15 \mu\text{m}$). Das stellt einen Zuwachs von 116 % in der ANG II-Gruppe (10^{-11}mol/l) dar. Die kombinierte Behandlung von Losartan (10^{-7}mol/l) mit ANG II (10^{-11}mol/l) vermochte ebenfalls den Axondurchmesser signifikant ($p < 0,05$ vs. Kochsalzkontrolle) zu erhöhen ($4,14 \pm 0,11 \mu\text{m}$ vs. $3,52 \pm 0,15 \mu\text{m}$). Wiederum zeigte die Kombination von ANG II (10^{-11}mol/l) und PD 123319 mit Werten von $3,61 \pm 0,11 \mu\text{m}$ keinen Effekt. Die Daten sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

3.3.4.2 Myelinisierungsgrad

Der Myelinisierungsgrad war in ANG II-behandelten Tieren (10^{-11}mol/l) signifikant ($p < 0,05$ vs. Kochsalzkontrolle) erhöht. Die mittlere Fläche der Myelinschicht maß $9,04 \pm 0,82 \mu\text{m}^2$, während die Kochsalz-Kontrollgruppe nur Werte von $7,07 \pm 0,45 \mu\text{m}^2$ für die Myelinschicht aufwies. In Übereinstimmung mit zu den funktionellen Untersuchungen erhöhte die Co-Behandlung mit Losartan (10^{-7}mol/l) und ANG II (10^{-11}mol/l) signifikant ($p < 0,05$ vs. Kochsalzkontrolle) die mittlere Fläche ($9,91 \pm 0,83 \mu\text{m}^2$ vs. $7,07 \pm 0,45 \mu\text{m}^2$). Die Kombination mit PD 123319 zeigte keinen den Myelinisierungsgrad positiv beeinflussenden Effekt ($6,68 \pm 0,51 \mu\text{m}^2$) (Tabelle 2).

Durchmesser der Axonkaliber und die Fläche der Myelinscheide

	NaCl	ANG II (10^{-11} mol/l)
		+ Losartan (10^{-7} mol/l)
		PD123319 (10^{-7} mol/l)
Axonkaliber [μm]	3.52 \pm 0.15	4.08 \pm 0.14*
Myelinscheide [μm^2]	7.07 \pm 0.45	9.91 \pm 0.83*
		3.16 \pm 0.11
		6.68 \pm 0.51

Tabelle 1: Dargestellt ist der Durchmesser der Axonkaliber und die Fläche der Myelinscheide im N. ischiadicus 10 mm distal zur Quetschläsion 21 Tagen nach Läsion. Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kochsalzkontrolle.

4. Diskussion

Zu Beginn dieser Dissertation gab es zahlreiche Hinweise darauf, dass ANG II über den AT₂-Rezeptor sowohl bei neuroregenerativen wie auch apoptotischen Prozessen eine Rolle spielt (Unger, 1999). Es war bekannt, dass die AT₂-Rezeptor-mRNA infolge Quetschläsion des N. ischiadicus der Ratte dramatisch hochreguliert wird (Gallinat et al., 1998). Weiterhin zeigte die Studie von Lucius und Mitarbeitern (1998), dass ANG II über den AT₂-Rezeptor direkt an neuroregenerativen Vorgängen im ZNS beteiligt sein kann.

Die im folgenden dargestellten Untersuchungen hatten das Ziel, Informationen über die physiologische Relevanz des AT₂-Rezeptors an neuroregenerativen Prozessen im peripheren Nervensystem zu gewinnen. Dazu wurden *in vivo*-Studien an adulten Ratten nach Quetschläsion des N. ischiadicus durchgeführt, die neben dem direkten Einfluss von AT₂-Rezeptoren auf die Regeneration im peripheren Nervensystem *in vivo* auch zum ersten Mal einen funktionellen Beweis für die neurotrophe Fähigkeit von ANG II zeigen sollten.

4.1 Experimentelles Modell

4.1.1 Modell zur lokalen Wirkstoffadministration

Das größte Problem bei der Beurteilung einer verbesserten peripheren Nervenregeneration, die durch potentielle neurotrophe Agenzien hervorgerufen wird, stellt die Suche nach einem zuverlässigen Applikationssystem dar, ohne dabei das umgebende physiologische Milieu aus dem Gleichgewicht zu bringen.

Eine systemische Applikation hat sich als schwierig erwiesen, da hierbei sehr große Substanzmengen benötigt werden. Weitere unkalkulierbare Faktoren einer systemischen Applikation liegen zum einen in einer eben auch möglichen systemischen Wirkung mit bislang nicht einschätzbaren potentieller Modulation des gesamten pathophysiologischen Modells, zum anderen aber auch im metabolischen Abbau und einer unbekanntem Konzentration der Substanzen am Wirkort, in diesem Fall der Läsionsstelle am Nerven (Rich et al., 1987).

Diese Umstände führten dazu, dass eine Vielzahl von Modellen zur lokalen Administration neurotropher Substanzen beschrieben wurde. So zeigten Experimente, die die in der Literatur am häufigsten verwendete Technik der Tubulisierung (Fixierung des distalen Nervenendes in einer Silikonkammer mit dortiger Wirkstoffapplikation) zu Grunde legten, für die Applikation der neurotropher Substanzen nur mäßigen Erfolg. Außerdem induzierten diese Katheter in dem zu untersuchenden Gebiet zumeist auch Entzündungen (Chen et al., 1989; Rich et al.,

1989; Santos et al., 1991), was wiederum zu erheblichen Ungenauigkeiten bei der Dateninterpretation führen kann.

Deshalb wurde für diese Studie ein experimentelles Modell etabliert, das solche vorbeschriebenen unerwünschten Effekte minimiert, da hierbei das Applikationssystem mit dem Nerven nicht direkt in Berührung kommt. Dementsprechend konnte bei keinem der für diese Studie verwendeten Versuchstiere eine sekundäre Schädigung der operierten Nerven eigens durch das Bewegungen oder Nagen der Versuchstiere, Anzeichen einer Infektion, eine Katheter-Dislokation oder eine Verstopfung des Schlauchsystems festgestellt werden.

4.1.2 ANG II-Stabilität in Lösung

Für eine lokale ANG II-Applikation über einen längeren Versuchszeitraum war die Gewährleistung der Stabilität des Peptids sowohl bei Körpertemperatur als auch über die gegebene Zeitspanne von entscheidender Bedeutung. Mit Hilfe eines Radioimmuno-Assays konnte gezeigt werden, dass sich die Konzentration einer im Brutschrank bei 37°C über 20 Tage inkubierten ANG II-Lösung nicht verringerte und somit stabil die gesamte Untersuchungsperiode überdauerte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es auch nicht zu Wirkstoffverlusten durch Adhäsion von ANG II am Katheter oder der Minipumpe kam. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die eingesetzten ANG II-Lösungen die Nervenläsionsstelle auch kontinuierlich mit der angesetzten Konzentration erreichten.

4.1.3 Der neurotrophe Faktor NGF als Positivkontrolle

Um die regenerationsfördernden Effekte der lokalen ANG II-Applikation einstuft zu können, wurde neben einer Negativkontrolle (physiologische Kochsalz-Lösung) ebenso eine Positivkontrolle benötigt.

Hierfür wurde NGF verwendet, ein neurotropher Faktor, von dem bekannt ist, dass seine lokale Applikation die periphere Nervenregeneration verbessert (Santos et al., 1998). NGF ist ein Protein, das sowohl im Zielgewebe als auch in den Schwann-Zellen des distalen Stumpfes gebildet wird und über seine neuronalen Rezeptoren nach retrogradem Transport zum neuronalen Soma, neurotrophe Effekte hervorruft (Johnson et al., 1986).

Hierbei wurden für NGF bisher zwei Rezeptortypen, die nach ihrer Affinität gegenüber Neutrophinen zu unterscheiden sind, beschrieben: der „high-affinity“-Rezeptor (trkA) mit Tyrosinkinase-Aktivität und der „low-affinity“-Rezeptor (p75NGFR) (Übersicht bei Clemens et al., 1997). Für den NGF „high-affinity“-Rezeptor (trkA) konnte unter anderem *in vitro*

gezeigt werden, dass er lokale Ereignisse zur Führung von dorsalen Wachstumskegeln vermittelt (Gallo *et al.*, 1997).

Für den NGF „low-affinity“-Rezeptor (p75NGFR) wiederum wurde ebenso wie für endogenes NGF nach Axotomie in motorischen Neuronen eine stark erhöhte Konzentration beschrieben (Heumann *et al.*, 1987; Taniuchi *et al.*, 1986). Der NGF „low-affinity“-Rezeptor (p75NGFR) jedoch kann auch, in Abwesenheit von NGF, einen programmierten Zelltod induzieren (Barrett und Georgiou, 1996).

Zur Expression von NGF-mRNA nach Verletzung des N. ischiadicus konnte gezeigt werden, dass es in adulten Ratten nach 3 bis 12 Stunden zu einem drastischen Anstieg kommt. Dabei folgt seine Expression einem biphasischen Zeitverlauf mit einem zweiten kurzen Expressionsmaximum 2 bis 3 Tage post laesionem.

Nach peripherer Nervenläsion spielt NGF für die Regeneration sowohl sensorischer als auch motorischer Neurone eine wichtige Rolle (Khouri *et al.*, 1989; Rich *et al.*, 1984,87; Taniuchi *et al.*, 1986). Hierbei kommt es zu einer Aufnahme von NGF aus umgebenden Schwann-Zellen und Zielgewebe entlang peripherer und spinaler Axone (Richardson und Riopelle, 1984).

Ferner konnte mehrfach gezeigt werden, dass sich durch NGF-Behandlung die Anzahl myelinisierter und nicht-myelinisierter Axone in durchtrennten Nerven erhöhen lässt (Chen *et al.*, 1989; Derby *et al.*, 1993; Gold *et al.*, 1991; Kuffler und Megwinoff, 1994; Oudega und Hagg, 1996; Pang *et al.*, 1993; Rich *et al.*, 1989). NGF kann durch Endozytose in die Zelle aufgenommen, mittels retrogradem axonalen Transport über oft weite Strecken in das kernnahe Zellsoma befördert werden und dann über Zwischenschritte die Transkription von Genen positiv oder negativ beeinflussen. NGF kann auch an der Zellmembran verbleiben und dort über eine Signaltransduktion schnelle und lokal begrenzte Effekte auslösen (Blöchl, 2001). Es wurde beschrieben, dass eine axonale Regeneration mit NGF dann erreicht werden kann, wenn NGF retrograd von axonaler Seite her transportiert wird und nicht, wenn es direkt in das Zellsoma appliziert wird (Gold and Spencer, 1993). Es finden sich jedoch in der Literatur auch Arbeiten, die beschreiben, dass sich auch direkt mittels lokaler NGF-Applikation am Ort der Nervenläsion initiale Schritte der Nervenregeneration verbessern lassen (Santos *et al.*, 1998).

NGF spielt auch bei läsionsbedingten Immunvorgängen eine Rolle. In diesem Zusammenhang werden NGF ähnliche Funktionen wie den Zytokinen zugeschrieben, die wichtige Auslöser und Regulatoren von Immunvorgängen sind. Nach Durchtrennung eines peripheren Nerven

setzen Fibroblasten-ähnliche Zellen der distalen Nervenöhle NGF frei. Die Schwann-Zellen beginnen Neurotrophine zu produzieren (NGF, BDNF, NT-4/5) und werden auto- und parakrin von NGF über den Rezeptor p75 zur Proliferation und zur Migration über die Verletzungsstelle hinweg zum proximalen Nervenende angeregt und stimulieren dort die rasch gebildeten axonalen Wachstumskegel mit Neurotrophinen (*Blöchl, 2001*).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Regenerationsverbesserung infolge lokaler ANG II- Behandlung nach Quetschläsion des N. ischiadicus ist vergleichbar mit den Ergebnissen, die durch eine lokale NGF-Applikation erzielt werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass ANG II ebenfalls eine Rolle als neurotropher Faktor im peripheren Nervensystem spielt. In Übereinstimmung mit den Daten, die von Santos und Mitarbeitern für NGF publiziert wurden (*Santos et al., 1998*), konnte in der vorliegenden Arbeit ein vergleichbar regenerationsfördernder Effekt von ANG II bei einer Konzentration von 10^{-11} mol/l und von NGF bei einer Konzentration von 0,22 µg/ml beobachtet werden.

4.1.4 Funktionelle Parameter der Nervenregeneration im verwendeten Modell

Derzeit sind eine Reihe von Methoden zur qualitativen Beurteilung von Nervenregeneration verfügbar. Allgemein wird hierbei angenommen, dass sich die regenerativen Vorgänge nach Nervenläsion mittels Messung wiedereinsetzender Nervenfunktionen elektrophysiologisch und funktionell erfassen lassen. Obwohl die Korrelation zwischen elektrophysiologischen und morphologischen Studien bereits beschrieben wurde (*Dellon und Mackinnon, 1989*), reflektieren diese Parameter alleine jeweils die gesamte Nervenfunktion nur unzureichend. In der vorliegenden Arbeit fanden daher zwei verschiedene methodische Ansätze Anwendung, die Fußabdruckanalyse und die Elektrostimulation der Fußsohle.

4.1.4.1 Fußspannenanalyse

Eine Methode zur Fußabdruckanalyse von Tieren mit und ohne Läsion des N. ischiadicus und die Korrelation dieser Ergebnisse mit der Nervenregeneration wurde als erstes von de Medinaceli und Mitarbeitern (*1982*) aufgezeigt. Die Arbeit von Bain und Mitarbeitern (*1989*) leistete einen bedeutenden Beitrag hinsichtlich der Definition der Parameter, welche die funktionelle Wiedererlangung der Nervenfunktion vom N. ischiadicus am besten repräsentieren. Die dort beschriebene Methodik wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der funktionellen Indizes am N. ischiadicus zu Grunde gelegt.

Der Vorteil der verwendeten Methode besteht darin, dass diese nicht invasiv ist und sich als kombinierte Bestimmung von sensorischer wie motorischer Wiedererlangung der

Nervenfunktion zeigte. Außerdem ist hiermit der zeitliche Verlauf von Regenerationsvorgängen durch wiederholte Messungen am gleichen Tier einfach und gut reproduzierbar nachzuvollziehen (*Walker et al., 1994*).

4.1.4.2 Sensomotorische Funktion nach Elektrostimulation

Um die Befunde der Fußspannenanalyse noch mit einem weiteren direkten funktionellen Korrelat zu vergleichen, wurde eine elektrische Stimulation der Fußsohle durchgeführt. Nach peripherer Nervenschädigung ist die Sensitivität auf eine Noxe der erste Beweis für die erfolgreiche Regeneration der Nervenfunktion (*Omer, 1981*). Mit Hilfe dieses Testes kann der Prozess der Reinnervation in unterschiedlichen Regionen der Fußsohle verfolgt werden. Ferner kann die Wachstumsgeschwindigkeit der Aussprossungen sowie die Reifung der sensorischen Funktion abgeschätzt werden. Die Ratten zeigen hierbei keine Konditionierung an diesen Test, auch nicht nach mehrfachem Aussetzen des schmerzhaften Stimulus (*de Koning et al., 1986*).

Es zeigte sich in dieser Versuchsreihe, dass die Ergebnisse der funktionellen Regenerationsanalyse beider Methoden gut miteinander korrelierten.

Nur bei den Ergebnissen innerhalb der ANG II (10^{-9} mol/l)-Gruppe fand sich ein Diskrepanz zwischen beiden Methoden. Obwohl die Fußspannen der mit ANG II (10^{-9} mol/l) behandelten Tiere gegenüber der Kochsalz-Kontrollgruppe signifikant vergrößerte (also einem einer physiologischen Abrollbewegung besser entsprechende) Werte aufwiesen, konnte dieser Befund jedoch durch den Elektrostimulationstest nicht bestätigt werden. Es wäre eine beschleunigte Reaktion gegenüber der Kochsalzkontrolle zu erwarten gewesen.

Da in der vorliegenden Arbeit erstmals diese beiden funktionellen Test parallel Anwendung fanden und direkt im gleichen Tier miteinander verglichen werden konnten, ist noch keine Aussage möglich, welche Methode welche Parameter der funktionellen Regeneration mit welcher Genauigkeit widerspiegelt. Auch sind bisher weder zur Elektrostimulation, die primär sensorische Nervenfasern anspricht, jedoch zur Reizbeantwortung auch die motorischen Fasern mit einbezieht, noch zur Fußabdruckanalyse, die hauptsächlich von motorischen Nervenfasern abhängig ist, aber auch sensorische Fasern erfordert, dezidierte Untersuchungen bzgl. jeweiliger Validität und Zeitspanne durchgeführt worden, durch die die Komponenten einer peripheren Regeneration jeweils erfasst werden können. Hierzu müssten neben weiteren funktionellen Tests übergreifende elektrophysiologische Untersuchungen und aufwändige histomorphologische Untersuchungen der regenerierenden motorischen und sensiblen Nervenanteile durchgeführt werden.

Da zum Entstehen eines Fußabdruckes im Rahmen von Geh- und Abrollbewegungen ein komplexes Zusammenspiel von motorischen aber auch sensorischen Nerven nötig ist, kann man sich vorstellen, dass der Funktionsausfall infolge der Quetschläsion des N. ischiadicus auch durch die Übernahme der Innervation durch andere Nervenweige in diesem Gebiet schon vor einem positiven Elektrostimulationstest z. T. kompensiert werden könnte z.B. durch Aussprossungen des N. saphenus. Es wäre daher theoretisch möglich, dass mit Hilfe dieser Methode eine Regeneration zwar schneller, aber weniger präzise bzw. selektiv für den N. ischiadicus diagnostiziert werden könnte als mit der Elektrostimulation, die hierbei spezieller die sensible Neurone aus diesem Nerven ansprechen könnte. Durch den longitudinal am meisten lateral lokalisierten Meßpunkt, der für den Elektrostimulationstest zugrunde gelegt wurde, konnten Verfälschungen durch Einsprossungen des N. saphenus, der zur Innervation des medialen Fußbereiches beiträgt, ausgegrenzt werden (*de Koning et al., 1986*).

Diese zeitverzögerte positive Reaktion auf die Fußsohlenstimulation zeigt weiterhin, dass eine lokale ANG II-Applikation keine Hyperalgesie am peripheren Nerven induziert, auf deren Folge die Schmerzschwelle herabgesetzt wird und die Tiere verfrüht eine positive Reaktion zeigen.

4.1.5 Morphologische Parameter der neuronalen Regeneration

4.1.5.1 GAP-43-Färbung

Wenn eine Axonverletzung vorliegt und somit die Leitung von Aktionspotentialen gestört ist, werden im Rahmen der neuronalen Regenerationsantwort zelluläre Reparaturprogramme aktiviert, die in verschiedener Hinsicht Programmen der Embryonalentwicklung entsprechen. Hierzu gehören neben einer verstärkten Tubulin-Expression, einer drastisch verminderten Neurofilament-Expression auch eine verstärkte „growth-associated protein-43“ (GAP-43)-Expression, (Goldstein *et al.*, 1988; Hoffman *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 1994 a, b; Muma *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1992; Wong und Oblinger, 1990). Wie bereits erwähnt, ist das Ziel einer jeden neuronalen Regeneration die axonale Elongation und schließlich die funktionell suffiziente Reinnervation des Zielorgans.

GAP-43 stellt hierbei einen Marker für die Zellkörperantwort nach Axonverletzung dar und markiert selektiv die regenerierenden Axone. Die Expression von GAP-43 ist bekanntermaßen nach einer N. ischiadicus-Läsion erhöht (van der Zee *et al.*, 1989) und identifiziert diejenigen Axone, die zu einer axonalen Regeneration fähig sind (Schaden *et al.*, 1994).

Während eine Überexpression von GAP-43 das Wachstum neuer Axone induziert (Aigner *et al.*, 1995), bewirkt das Fehlen dieses Proteins eine schlechtere Adhärenz der Neuriten am Substrat verbunden mit einer größeren Instabilität (Aigner *et al.*, 1995).

Eine geordnete Entwicklung bzw. Regeneration des Neurons erfordert demnach unbedingt das Vorhandensein von GAP-43. Folglich kann das Ausmaß der GAP-43-Expression als Marker für eine Regeneration verletzter peripherer Neurone verwendet werden. Eine AT₂-Rezeptor-vermittelte GAP-43-Expression steht somit in direkter Korrelation zur neuronalen Regeneration des N. ischiadicus infolge Verletzung.

Zur Quantifizierung der ANG II-induzierten neuronalen Regeneration am morphologischen Erscheinungsbild des Nerven wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst eine Antikörper-Färbung der Axone des N. ischiadicus gegen GAP-43 durchgeführt. Die lokale ANG II-Applikation bewirkte eine im Vergleich zu den Kontrollen verstärkte Zellkörperantwort nach Axonverletzung (Zunahme der Anzahl GAP-43-positiven Nervenfasern), die auf eine verstärkte regenerative Kapazität der Neuronen hindeutet. Eine Quantifizierung der GAP-43-Expression konnte jedoch nicht erfolgen, da sowohl Lokalisation als auch Zeitpunkt der immunhistologischen Färbung sich im nachhinein als wenig geeignet erwiesen.

Aus Immunfluoreszenzstudien von Verhaagen und Mitarbeitern (1988) ist bekannt, dass bereits 6 Tage nach Quetschläsion des N. ischiadicus die neugeformten Aussprossungen eine

Länge von ungefähr 15 mm distal zur Läsionsstelle aufweisen. Es ließ sich demzufolge nach 21 Tagen nicht die Spitze des Wachstumskegels in dem gewählten Segment (10 mm distal zur Läsionsstelle) bestimmen. Erschwerend kommt außerdem noch hinzu, dass die regenerierenden Axone des peripheren Nervens nicht, entgegen dem Verhalten zentraler Nerven, ein durch die Quetschläsion begrenztes Wachstum aufweisen. Der proximale Axonstumpf eines zentralen Nerven beginnt zwar unmittelbar nach Durchtrennung spontan wieder auszuwachsen, er stellt jedoch am Läsionszentrum kurz darauf abrupt sein Wachstum wieder ein. Die dort ausgebildete Läsionsnarbe stellt eine bislang schwer überwindbare Barriere für wachsende Axone dar und behindert somit eine Regeneration nach ZNS-Läsion.

Somit konnten Unterschiede in der Auswachsgeschwindigkeit zwischen den einzelnen Gruppen nicht valide quantifiziert werden. Allerdings konnte dennoch ein deutlicher Trend in Richtung verstärkter Farbintensivität der GAP-43-Färbung in der mit ANG II (10^{-11} mol/l) behandelten Gruppe sowie in der mit der Kombination Losartan (10^{-7} mol/l) und ANG II (10^{-11} mol/l) behandelten Gruppe gezeigt werden. Da der GAP-43-Gehalt proportional mit der Anzahl der Aussprossungen korreliert (*van der Zee et al., 1989*), reflektiert eine stärkere Farbintensität eine verbesserte neuronale Regeneration.

Da aus den bereits angeführten Gründen zum gewählten Zeitpunkt nicht mehr die Spitze des Wachstumskegels im gewählten Segment zu bestimmen war, sondern die Regeneration schon so weit fortgeschritten war, dass die Unterschiede in den Farbintensivitäten immer mehr zu verwischen begannen, wurde auf eine computergesteuerte Auswertung verzichtet. Vielmehr wurde eine weitere Methode, die Myelinscheidenfärbung, herangezogen, welche die funktionelle Regenerationsbeschleunigung nach ANG II-Behandlung auch direkt am morphologischen Erscheinungsbild des Nerven nach 21 Tagen demonstrieren kann.

4.1.5.2 Axondurchmesser, Myelinscheidendicke und Anzahl der myelinisierten Axone

Die Quantifizierung der ANG II-induzierten neuronalen Regeneration wurde zusätzlich durch eine morphometrische Auswertung von lichtmikroskopischen Befunden vorgenommen.

Die morphologische Betrachtung der regenerierenden Neurone in Folge einer Nervenläsion gibt Aufschluss über den Reifungsgrad der neu ausgewachsenen Axone. Die im Anschluss erstellte morphometrische Analyse von Axondurchmesser und Myelinscheidendicke quantifiziert den Grad der axonalen Regeneration. Diese Methode stellt ein weitverbreitetes Verfahren zur Charakterisierung neuronaler Strukturen und darüber hinaus zur Validierung *in vivo* erfasster funktioneller Parameter dar (*Wang et al., 1997*).

Es war im lichtmikroskopischen Bild eindeutig eine verbesserte morphologische Struktur der mit ANG II behandelten Nerven erkennbar. Diese Erkenntnisse konnten durch die morphometrische Analyse der Axonkaliber und Myelinscheidendicke bestätigt werden.

Weiterhin zeigte die elektronenmikroskopische Analyse eine zeitabhängige Vergrößerung des Axondurchmessers sowie mehr myelinisierte Axone in der mit ANG II (10^{-11} mol/l)-behandelten Gruppe nach 21 Tagen verglichen mit der Situation nach 10 Tagen nach Quetschläsion.

4.2 Einfluss von ANG II auf die neuronale Regeneration in vivo

Der wichtigste Befund dieser Arbeit ist die Beobachtung, dass ANG II über den AT₂-Rezeptor die morphologische, axonale, aber insbesondere die funktionelle Nervenregeneration nach Läsion des N. ischiadicus signifikant beschleunigt. Die Daten der vorliegenden Dissertation (*Reinecke et al., 2003*) erweitern somit die bis dato vorhandenen Beobachtungen (*Lucius et al., 1998*), dass ANG II über den AT₂-Rezeptor als ein neurotropher Faktor agieren kann, indem sie erstmals auch funktionelle Beweise für die neuroregenerative Potenz von ANG II und dem AT₂-Rezeptor liefern.

4.2.1 Konzentrationsabhängigkeit der neurotrophen ANG II-Wirkung

Die Befunde dieser Arbeit zeigen deutlich, dass die morphologische und funktionelle neuronale Regeneration, die durch eine lokale ANG II-Applikation vermittelt werden kann, dosisabhängig ist.

Hierbei korrelieren applizierte ANG II-Konzentration und die Verbesserung bzw. Beschleunigung der neuronalen Regeneration zueinander im inversen Verhältnis: Mit fallender Konzentration der applizierten ANG II-Lösung verbesserte sich die beobachtete Regenerationsgeschwindigkeit. Dieses Ergebnis konnte im verwendeten experimentellen Modell durch die unterschiedlichen Untersuchungsansätze jeweils unabhängig voneinander validiert werden.

Am wirkungsvollsten zeigte interessanterweise die niedrigste verwendete Konzentration von 10⁻¹¹ mol/l ANG II in den unterschiedlichen Untersuchungsansätzen eine Verbesserung der neuronalen Regeneration. Inwieweit und ob bei weiterer Reduktion der applizierter ANG II-Konzentration auch noch eine weitere Verbesserung der neuronalen Regeneration hätte erreicht werden können, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden, erscheint aber eher als unwahrscheinlich, da, wie bereits eingangs erwähnt, diese ANG II-Konzentration von 10⁻¹¹ mol/l der für Schwann-Zellen beschriebenen endogenen ANG II-Produktion entspricht (*Bleuel et al., 1995a*) und somit gewissermaßen als physiologisch sinnvolle Konzentration erscheinen darf

Vom funktionellen Standpunkt aus zeigten die Tiere unter ANG II eine schnellere Wiedererlangung der Funktion in dem von der Nervenläsion betroffenen Hinterfuß. Dieser Befund korrelierte im morphologischen Erscheinungsbild mit signifikant mehr größeren, myelinisierten und somit regenerierten Axonen.

Ein weiterer bemerkenswerter Befund in diesem Zusammenhang ist, dass die bei dieser geringen Konzentration beobachteten maximalen Effekte von ANG II auf die

Nervenregeneration mit denen durch die Positivkontrolle mit denjenigen von 0,22µg/ml NGF (siehe auch Kapitel 4.1.3 *Der neurotrophe Faktor NGF als Positivkontrolle*), einem für seine diesbezügliche Wirksamkeit gut bekannten neurotrophen Faktor (*Chen et al., 1989; Rich et al., 1987*), durchaus vergleichbar sind.

4.2.1.1 Konzentrationsabhängige Mechanismen

Interessanterweise wirkten die höheren ANG II-Konzentrationen (10^{-7} mol/l und 10^{-9} mol/l) in diesem Versuchsaufbau jeweils weniger neurotroph bzw. wirkten einer Nervenregeneration sogar entgegen. Die genauen Mechanismen hierfür sind derzeit noch unklar. Jedoch konnte in bislang noch unveröffentlichten Daten dieses Labors auch *in vitro* in neuronalen Zelllinien festgestellt werden, dass überall dort, wo geringe Konzentrationen von ANG II ein Neuritenwachstum deutlich förderten, hohe Konzentrationen von ANG II dieses Wachstum jedoch inhibierten.

Folgende Mechanismen könnten hierbei eine Rolle spielen:

1. Induktion von Apoptose bei höherer ANG II-Konzentration:

Unter pro-apoptotischen Bedingungen (die genaue Definition ebensolcher ist jedoch in der Literatur noch nicht einheitlich festgelegt) kann ANG II über den AT₂-Rezeptor nicht nur Regeneration und Zelldifferenzierung vermitteln, sondern auch Apoptose (*Unger, 1999*).

Da die AT₂-vermittelten apoptotischen Vorgänge mit der ebenfalls AT₂-vermittelten neuronalen Regeneration im engen Zusammenhang stehen, sollen sie im *Kapitel 4.2.2 Induktion von Apoptose nach experimenteller Nervenläsion* nachfolgend noch gesondert diskutiert werden (siehe auch Kapitel 1.1.4 *Apoptose und Nekrose bei Nervenläsionen*).

2. Disbalance von gegenläufigen Wirkungen des AT₁- und AT₂-Rezeptors

In Übereinstimmung zu anderen Arbeiten weisen die Daten dieser Dissertation darauf hin, dass es unter bestimmten Krankheitsbedingungen, wie eben auch in diesem speziellen pathophysiologischen Modell der Quetschläsion eines peripheren Nervens, zu einem gestörten Gleichgewicht der zum Teil gegenläufigen und einander kompensierenden Wirkungen von AT₁- und AT₂-Rezeptoren und somit zu einem veränderten Nettoeffekt des RAS insgesamt kommen kann.

Es gibt mehrer Hinweise, dass in dem hier vorliegenden Modell AT₁-Rezeptor-vermittelte Effekte ursächlich dafür verantwortlich sind, dass ANG II-Konzentrationen oberhalb einer Konzentration von 10^{-11} mol/l eine Neuroregeneration langsamer bzw. überhaupt nicht mehr fördern.

So zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass durch eine alleinige, selektive Blockade der AT₁-Rezeptoren mittels Losartan, welche die AT₂-Rezeptoren unbeeinflusst lässt, die funktionelle Nervenregeneration, gemessen in der Fußspannenanalyse und der sensomotorischen Reizantwort (*Abbildungen 11 und 18*), jeweils signifikant beschleunigt werden konnte. Diese Effekte wurden durch zusätzliche gleichzeitige Applikation von 10⁻¹¹ mol/l ANG II noch weiter verbessert. Durch eine alleinige oder mit gleichzeitiger ANG II-Gabe vergesellschafteter Blockade der AT₂-Rezeptoren durch PD 123319 konnte gegenüber Placebo keine signifikante Verbesserung beobachtet werden. Sobald also der offensichtlich neuroregenerativ wirksame AT₂-Rezeptor blockiert ist, entfaltet ANG II über die nicht blockierten AT₁-Rezeptoren keinerlei neurotrophe Wirkung mehr.

Diese Daten belegen somit deutlich, dass, zumindest im verwendeten Modell, die neurotrophen Signale von ANG II fast ausschließlich über den AT₂-Rezeptor vermittelt werden. Der AT₁-Rezeptor könnte jedoch hierbei sogar direkt Effekte vermitteln, die einer neuronalen Regeneration aktiv entgegenwirken.

Diese These wird von einer Arbeit weiter unterstützt, die beschreibt, dass neuronale AT₁-Rezeptoren am apoptotischen Zelltod nach ischämischer Schädigung maßgeblich beteiligt sind (*Walther et al., 2002*). Aber auch andere Arbeiten spekulieren, dass relativ hohe ANG II-Dosen über AT₁-Rezeptoren den AT₂-Rezeptor-vermittelten Effekten entgegenwirken (*Laflamme et al., 1996; Tanaka et al., 1995; Yamada et al., 1996*).

Von den Signaltransduktionswegen, die mit neuronalem Tod assoziiert sind, könnte dabei vor allem dem Stress-aktivierten Proteinkinase/c-Jun N-terminalen Kinase (SAPK/JNK)-Transduktionsweg eine wichtige Rolle nach Nervenläsion zukommen (*Dragunow et al., 1993; Vaudano et al., 2001*). In diesem Zusammenhang konnten entsprechende Studien eine erhöhte c-Jun-Expression sowie der Stresskinase „c-Jun N-terminale Kinase“ (JNK) nach Axotomie zeigen (*Herdegen et al., 1998; Kenney und Kocsis, 1988; Leah et al., 1993*). Es wurde gezeigt, dass ANG II via des AT₁-Rezeptor SAPK/JNK aktivieren kann und darüber in VSMC das Wachstum durch proapoptische oder antiproliferative Effekte regulieren kann (*Ip und Davis, 1998*).

Jedoch ist die präzise Rolle der beobachteten neuronalen c-Jun-Expression als Reaktion auf axonale Verletzung widersprüchlich, denn die Expression bzw. Aktivierung von c-Jun wird mit beiden Abläufen in Zusammenhang gebracht, sowohl mit der Regeneration von Neuronen, als auch mit der Vermittlung von neuronalem Zelltod.

Ein weiterer Mechanismus, der im vorliegenden experimentellen Modell für die Disbalance von gegenläufigen Wirkungen des AT₁- und AT₂-Rezeptors und für den Nettoeffekt des RAS auf die neuronale Regeneration bedeutsam sein könnte, ist die Modulation der proteolytischen Aktivität.

So wurde beschrieben, dass das Zusammenspiel von AT₁- und AT₂-Rezeptoren nach Stimulation mit relativ hohen ANG II-Konzentrationen (1mM) an der Modulation der proteolytischen Aktivität des extrazellulären Mikro-Milieus von Neuronen beteiligt ist. So bewirkte ANG II in Primärkulturen von Schwann-Zellen eine Unterdrückung der Synthese des Serin-Proteasen-Inhibitors Protease Nexin-1 (PN-1) (*Bleuel et al., 1995a*). PN-1 stellt einen potenten Inhibitor von Serinproteasen, wie z.B. Thrombin und Plasminogen dar, welche in den extrazellulären Raum sezerniert werden und dann am autolytischen Neuronenabbau geschädigter Nerven beteiligt sein können. Nach Verletzung des N. ischiadicus wird PN-1 zum Schutze der Motoneurone vor einem Axotomie-vermittelten Zelltod induziert (*Houenou et al., 1995*). Diesbezüglich konnten auch Meier und Mitarbeiter (*1989*) bei Ratten zeigen, dass eine Verletzung des N. ischiadicus die Induktion der PN-1-Synthese innerhalb der Schwann-Zell-Subpopulation distal der Verletzung triggert.

Da für die Serinprotease Thrombin *in vitro* gezeigt wurde, dass sie zum Kollaps von Neuriten führen kann (*Gurwitz und Cunningham, 1988; Suidan et al., 1992*), kann somit im Umkehrschluß vermutet werden, dass ihre Hemmung durch PN-1 die verbleibenden neuronalen Strukturen an der Läsionsstelle vor einer andauernden und extensiven proteolytischen Zerstörung schützt. Auch in Alzheimer-erkrankten Gehirnen konnte eine deutliche Verringerung von PN-1 beschrieben werden, die mit Destruktionen neuromorphologischer Strukturen korreliert (*Choi et al., 1995; Vaughan et al., 1994*).

Diesen Erkenntnissen zufolge, zusammen mit der Berücksichtigung der zelltypspezifischen Expression von AT₂-Rezeptoren (siehe *1.3.4. Zelltypspezifische Expression von AT₂-Rezeptoren*), scheint es möglich, dass AT₂-Rezeptoren ihre Wirkung über autokrine und parakrine Wege ausüben. Nach den oben genannten Befunden wären diese im wesentlichen (1.) eine Modulation der Schwann-Zell-Aktivität durch Produktion neurotropher Faktoren (z.B. NGF) und Myelindegeneration, (2.) eine Präparation der Schwann-Zellen für nachfolgende Synthese der Myelinscheide oder Differenzierung von Vorläuferzellen vom prae-myelinisierten Phänotyp zu myelinisierten Schwann-Zellen über NF-κB sowie (3.) eine Beeinflussung der Funktion von Makrophagen.

Die überwiegend auto- und parakrine Regulation des jeweils gewebespezifischen lokalen RAS mit seiner komplexen, multifaktoriell regulierten Antwort auf verschiedene pathophysiologische Bedingungen spielt nach heutigem Kenntnisstand nicht nur bei neuroregenerativen Prozessen, sondern letztlich bei der Gewebemöostase aller Organe eine wichtige Rolle. In praktisch allen Organen scheinen den schon lange bekannten wachstumsfördernden Wirkungen des AT₁-Rezeptors antiproliferative und differenzierungsfördernde Effekte des AT₂-Rezeptors gegenüber zu stehen. Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen diesen entgegengesetzten Wirkungen des AT₁- und AT₂-Rezeptors könnte damit den Nettoeffekt des RAS in vielen Krankheitssituationen verändern (*Fischer et al., 2001; Laflamme et al., 1996; Stoll et al., 1995a, 2002*).

Da bei den Versuchen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, äußerst niedrige Konzentrationen an ANG II eingesetzt wurden, darf angenommen werden, daß es nicht durch unphysiologisch hohe ANG II-Konzentrationen zu unspezifischen Bindungen und Aktivierungen an beiderlei Angiotensin-Rezeptoren kam. Entsprechend dürfen daher auch die Effekte der verwendeten, jeweils spezifischen Rezeptorenblocker den AT₁- bzw. AT₂-Rezeptoren zugeordnet werden.

4.2.2 Induktion von Apoptose nach experimenteller Nervenläsion

Wie eingangs erwähnt (Kapitel 1.1.3 *Pathophysiologie unterschiedlicher Nervenläsionen*) geht die Mehrzahl der Nervenzellen nach mechanischer Quetschläsion, wie sie hier als Pathomechanismus experimentell induziert worden war, durch Vorgänge zugrunde, die aufgrund ihres histomorphologischen und zytochemischen Ablaufes der Apoptose (siehe auch Kapitel 1.1.4 *Apoptose und Nekrose bei Nervenläsion*) zugeordnet werden (Übersicht bei *Haunstätter und Izumo, 1998*).

Generell gesehen ist Apoptose eine komplexe Reaktionskaskade, die durch viele Faktoren wie entwicklungs- oder umweltbedingte Stimuli, DNA-Schädigung, Hypoxie, oxidativer Stress, Verlust des Zell-Zell-Kontaktes, Bindung apoptotischer Faktoren an spezifischen Rezeptoren oder die Abwesenheit neurotropher Faktoren getriggert werden kann (*Jaimes et al., 1998; Leri et al., 2000, Li W. et al., 1998; Raff, 1992*).

Nachfolgend sollen nun Mechanismen diskutiert werden, die im hier verwendeten pathophysiologischen Modell bei der Initiierung von Apoptose wichtig sein könnten.

4.2.2.1 Dichotomien von Nervenläsionen in Regeneration oder Apoptose

Eine Axonunterbrechung bewirkt eine komplexe neuronale Antwort, die entweder zum Absterben oder zur Regeneration von Neuronen führen kann. Eine Reihe von Beobachtungen bestätigen die Annahme, dass eine neuronale Verletzung, zumindest in ihrem frühen Geschehen, eine Serie molekularer Ereignisse initiiert, die identisch für sowohl Regeneration als auch Apoptose sind. Für die betroffene Nervenzelle sind also die Reaktionskaskaden, die zu einem grundsätzlich unterschiedlichen Schicksal führen, eng miteinander vergesellschaftet. So kann beispielsweise zunächst die Regulation von Transkriptionsfaktoren, wie die von c-Jun, die im Rahmen der frühen Zellantwort nach Axotomie bereits 10 bis 20 Stunden post laesionem vermehrt exprimiert werden (*Leah et al., 1991*), nach Axotomie zunächst in die Richtung beider Reaktionskaskaden, Apoptose wie auch Regeneration, weisen (*Herdegen et al., 1997*).

Derartige Dichotomien, also gegensätzliche Wirkungen eines Agonisten, die über einen einzigen Rezeptor vermittelt werden, sind auch aus anderen Systemen bekannt. Von dem neurotrophen Faktor BDNF weiss man beispielsweise, dass er die Regeneration retinaler Ganglienzellen *in vivo* zwar verbessern kann (*Klocker et al., 1998*), aber auch, durch eine Tyrosinkinase Rezeptor B-vermittelte Erhöhung von NO den lokalen oxidativen Stress vergrößern kann und somit regenerativen Prozessen eher entgegenwirkt. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass, wenn diese Radikalsynthese durch die Gegenwart eines NO-Synthase-Hemmstoffes unterbunden wurde, der neurotrophe Faktor BDNF eine größere regenerative Potenz entwickelte (*Klocker et al., 1998*).

Auch die zelluläre Lokalisation der axonalen Schädigung (Kapitel 1.1.3 *Pathophysiologie unterschiedlicher Nervenläsionen; Abbildung 1*) beeinflusst durch bisher noch nicht geklärte Mechanismen, ob ein Neuron eher durch Apoptose zugrunde geht oder aber eine Regeneration stattfinden kann (*Herdegen et al., 1997*). Neurone von Säugetieren, die zellkörpernah verletzt wurden, zeigen eine starke Zellkörperantwort und eine hohe regenerative Kapazität, aber auch gleichzeitig ein hohes Risiko für Apoptose. Werden Axone weiter distal verletzt, ist die regenerative Potenz zwar geringer, aber die Neurone zeigten sich auch weniger anfällig für Apoptose.

Nach Axonverletzung ist das Ziel der Nervenzelle bei neuronaler Regeneration die axonale Elongation und die Reinnervation des Zielorgans. Es werden deshalb im Rahmen der neuronalen Regenerationsantwort Reparaturprogramme aktiviert, die, wie schon zuvor erwähnt, in verschiedener Hinsicht Programmen aus der Embryonalentwicklung entsprechen.

Dazu gehören u.a. eine verstärkte GAP-43-Expression, eine verstärkte Tubulin-Expression, aber auch eine drastisch verminderte Neurofilament (NF)-Expression (*Goldstein et al., 1988; Hoffmann et al., 1993; Jiang et al., 1994a,b; Lehtonen et al., 1999a,b; Muma et al., 1991; Schwartz et al., 1992; Wong und Oblinger, 1990*).

Eine verminderte NF-Expression im geschädigten Nerven kann aber ebenfalls wieder zweierlei bedeuten. Zum einen kann sie in regenerierenden Nerven beobachtet werden, zum anderen aber auch im Rahmen der Apoptose. So konnten Estus und Mitarbeiter (*1994*) an neuronalen Primärkulturen zeigen, dass die NF-Expression vermindert war, wenn den neuronalen Zellen der neurotrophe Faktor NGF entzogen wurde. Diese Situation ist apoptotischen Bedingungen vergleichbar.

Nach einer axonalen Läsion ist die Funktionsfähigkeit der entsprechenden Nerven eingeschränkt. Für die Phase der Regeneration, in der nur ein eingeschränkte bzw. keine Leitung von Aktionspotentialen erfolgt, ist ein großer Axondurchmesser nicht nötig. Vielmehr sind die Aktionen der Zelle darauf ausgerichtet, die entstandenen Schäden zu beseitigen, und wohl daher wird die Expression der Neurofilamente vermindert.

4.2.2.2 Angiotensin II und Apoptose

Hier sollen Abläufe diskutiert werden, die durch ANG II bzw. eine pharmakologische Blockade von AT₁- und AT₂-Rezeptoren, die Kaskade apoptotischer Vorgänge potentiell modulieren können (*Lucius et al., 1999; Unger 1999*) (Abbildung 22).

Zwar standen für die vorliegende Dissertation noch keine direkten eigenen Daten über Apoptose im verwendeten experimentellen Modell vor; die Ergebnisse zeigen jedoch eindeutig, dass durch höhere ANG II-Konzentrationen die funktionelle wie morphologische Regeneration nachteilig bzw. zumindest nicht signifikant unterschiedlich zu einer Placebo-Behandlung beeinflusst wurden. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit einer Reihe von nachfolgend aufgeführten Untersuchungen, die eine konzentrationsabhängige Wirkung des RAS auf die neuronale Regeneration zeigten.

Die Rolle beider Angiotensin-Rezeptor-Subtypen für die apoptotische Reaktionskaskade wird teilweise noch kontrovers diskutiert. Wurde anfangs vor allem die Meinung postuliert, dass ANG II über AT₁-Rezeptoren in erster Linie Mechanismen der Zellproliferation induziert und über AT₂-Rezeptoren eher apoptotische Vorgänge initiieren würde (*Stoll et al., 1995b; Yamada et al., 1996*), so zeigt sich in jüngerer Zeit zusehends die ganze Komplexität des Geschehens. Neuere *in vivo* und *in vitro* Studien legten eine Beteiligung beider Rezeptortypen an jeweils Proliferation wie auch Apoptose nahe (*Anversa, Cao et al., 2000; Leri et al., 1998*).

Eine Erhöhung der Apoptoserate unter pro-apoptotischen Bedingungen durch AT₂-Rezeptor-Aktivierung konnte anhand verschiedener Zellkultur-Typen wie fetale Nebennierenzellen, neuronale Zellen, ovariäre Granulosazellen und neonatale Kardiomyozyten gezeigt werden (*Chamoux et al., 1999; Dimmeler et al., 1997; Lehtonen et al., 1999 a,b; Shenoy et al., 1999; Tanaka et al., 1995*).

Aber auch für den AT₁-Rezeptor konnte durch *in vitro*-Studien gezeigt werden, dass seine Aktivierung in kultivierten adulten ventrikulären Myozyten (*Leri et al., 2000*) und humanen Endothelzellen der Koronararterien (*Li D.Y. et al., 1998*) die Apoptoserate fördern kann.

Die unterschiedlichen apoptotischen Effekte von AT₁- und AT₂-Rezeptoren, die in verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*- Studien beobachtet wurden, können nur bei genauer Kenntnis der jeweils gewebespezifischen Expression bzw. Verteilung der einzelnen ANG II-Rezeptor-Subtypen diesen auch eindeutig zugeordnet werden. Insofern ist es für die Diskussion dieser Daten wichtig, dass die Ergebnisse anhand einer Zelllinie nicht ohne weiteres auf eine andere oder auf den Kontext *in vivo* extrapoliert werden können. Ebenso muss bei einer vergleichenden Diskussion der vorliegenden Daten beachtet werden, inwieweit bei anderen Studien eventuelle Unterschiede aufgrund einer ggf. anderen Verteilung und relativen Mengen der ANG II-Rezeptor-Subtypen in fetalem und adultem Gewebe berücksichtigt werden müssen. Die Gesamtheit der bislang vorliegenden Studien verdeutlicht, dass ANG II Apoptose über verschiedene Rezeptoren und Signalwege, abhängig von Zelltyp, Alter der Tiere und lokaler Gewebemöiostase, induzieren kann.

In jüngerer Vergangenheit haben eine Reihe von Studien dazu beigetragen, dass sich das Verständnis der zellulären und molekularen Mechanismen, die der ANG II-induzierten Apoptose unterliegen, erheblich erweitert hat. Im folgenden sollen die diesbezüglich bisher bekannten Mechanismen von AT₁- und AT₂-Rezeptor-Aktivierung bei Apoptose kurz gegenüber gestellt werden.

Da jedoch die Daten der vorliegenden Arbeit darauf hindeuten, dass die neuroregenerative Wirkung von ANG II über die AT₂-Rezeptoren vermittelt werden, die AT₁-Rezeptoren aber nicht neurotroph, sondern womöglich sogar direkt regenerationshemmend wirken (insbesondere bei der Wiedererlangung der sensomotrischen Funktion nach Elektrostimulation fand sich bei beiden höheren ANG II-Konzentrationen ein gegenüber Placebo sogar nachteiliger Effekt), soll auch diskutiert werden, inwieweit die bekannten Einflüsse des RAS auf apoptotischen Zelltod diesen Befund erklären könnte.

4.2.2.2.1 Der AT_2 -Rezeptor und Apoptose

Der AT_2 -Rezeptor aktiviert Tyrosin-Phosphatasen wie z.B. MAP Kinase-Phosphatase-1 (MKP-1) und hemmt die Signal-verbundenen extrazellulären MAP Kinasen ERK1/2. Ersteres resultiert in einer Dephosphorylierung von „B-cell lymphoma 2 gene“ (Bcl-2, eines der anti-apoptotischen Proteine aus der in ihrer Funktion bisher noch nicht genau verstandenen Familie der Bcl-2-Proteine) und einer Hochregulation von pro-apoptotischen Bax-Gene, wie Untersuchungen anhand morphologischer Zellveränderungen und internukleosomaler DNA-Fragmentierungen („DNA-laddering“) unter exakt definierten Zellkulturbedingungen an PC12W- und R3T3-Zellen zeigen konnten (*Horiuchi et al., 1998; Yamada et al., 1996*).

Der AT_2 -Rezeptor scheint hierbei die ERK-Aktivität abhängig vom allgemeinen zellulären Input zu modulieren: Unter Bedingungen, die ein Neuritenauswachsen ermöglichen, erhöht die alleinige Stimulation mit ANG II die ERK-Aktivität in PC12W-Zellen, während die NGF-vermittelte ERK-Aktivierung durch eine ANG II-Co-Stimulation in diesen Zellen vermindert wurde (*Stroth et al., 2000*). Die Inaktivierung von ERK1/2 ist über G_i -Protein-Kopplung durch die einzige intrazelluläre dritte Schleife des AT_2 -Rezeptor vermittelt (*Horiuchi et al., 1998; Lehtonen et al., 1999b*).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Interferon regulierende Faktor-1 (IRF-1) AT_2 -Rezeptoren in apoptotischen Zellen heraufreguliert. Dieser Befund deutet auf eine möglicherweise durch AT_2 -Rezeptor induzierte Apoptose hin (*Horiuchi et al., 1999*).

Eine weitere Arbeit, die über eine AT_2 -Rezeptor-vermittelte Apoptose unter Hemmung der MAP-Kinase-Aktivität berichtet, beschreibt zudem auch eine verminderte Konzentration von „Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase“ (PARP), welche an DNA-Reparaturprozessen in den betroffenen Zellen beteiligt ist (*Shenoy et al., 1999*). Diese Untersuchung wurde an Neuronen aus dem Hypothalamus/Hirnstamm durchgeführt. Eine Stimulation dieser Neurone mit ANG II ohne vorherige UV-Bestrahlung induzierte weder Apoptose noch eine Aktivierung der Stresskinase „c-Jun N-terminale kinase“ (JNK). Erst nach UV-Bestrahlung rief der Zusatz von ANG II eine Potenzierung der AT_2 -Rezeptor-vermittelten Apoptose hervor.

Ein anderer Aspekt der bisher bekannten AT_2 -Rezeptor-vermittelten pro-apoptotischen Kaskade stellt die Expression des p53-Gens, eines weiteren potenten Apoptose-Induktors, dar (*Morrissey und Klahr, 1999*).

Auch wurde vermutet, dass über den AT_2 -Rezeptor möglicherweise in relevantem Ausmaß eine lokale NO-Produktion vermittelt werden könnte, worüber er dann ebenfalls eine

bedeutsame Rolle an der Induktion apoptotischer Vorgänge haben könnte (*de Gasparo und Siragy, 1999; Gohlke et al., 1998*).

Mit diesen Ergebnissen konform geht auch eine Studie an Endothelzellen, in der gezeigt wurde, dass die AT₂-Rezeptor-vermittelte Apoptose mit einer Aktivierung der Protease Caspase-3 (CPP-32) einhergeht, die wiederum die DNA-Polymerase PARP als Substrat umsetzen kann (*Dimmeler et al., 1997*). Diese Beobachtung ist noch unter einem weiteren Aspekt interessant, da CPP-32 ein bekanntes Substrat für Ceramide darstellt.

Ceramide agieren beinahe ubiquitär als lipidische intrazellulärer Botenstoff („second messenger“) und stellen einen wichtigen Mediator des programmierten Zelltods dar, sind aber auch an zellulärer Differenzierung und Proliferation beteiligt. Sie können entweder de novo durch Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA synthetisiert werden oder durch Hydrolyse von Sphingomyelin durch Sphingomyelinasen.

Dass die Bildung von Ceramiden über ANG II und AT₂-Rezeptoren *in vitro* konzentrationsabhängig beeinflussbar war (*Gallinat et al., 1999; Lethonen et al., 1999*), könnte auch für die Interpretation der in der vorliegenden Dissertation beschriebenen konzentrationsabhängigen Effekte von ANG II auf die Nervenregeneration von großer Bedeutung sein: Die Tatsache, dass hohe ANG II-Konzentrationen auch einen entsprechend beschleunigten und insgesamt stärkeren Anstieg von Ceramiden nach sich zogen, könnte im Umkehrschluss auch bedeuten, dass die höheren ANG II-Dosierungen (10⁻⁷ M, 10⁻⁹ M), die in dieser Arbeit *in vivo* Verwendung fanden, gegenüber der niedrigeren Dosierung (10⁻¹¹ M) eine schlechtere Wirkung auf die neuronale Regeneration zeigten, weil ihr eine Ceramid-induzierte, gesteigerte Apoptose entgegenstand.

Abschließend soll über die umfangreichen pro-apoptotischen Effekte der Ceramide auch noch gesagt werden, dass auch für die oben beschriebene AT₂-Rezeptor-vermittelte Aktivierung von Stress-Kinasen, wie der Phosphatase MKP-1, mit nachfolgender Dephosphorylierung von Bcl-2 und Caspasen wie der Caspase-3 (*Horiuchi et al., 1997; Yamada et al., 1996*), zum Teil Ceramid-abhängige Mechanismen beschrieben wurden (*Dimmeler et al., 1997*).

Dies gilt auch für die Ceramid-vermittelte Aktivierung von TNF- α sowie für eine Aktivierung des nuklearen Transkriptionsfaktors NF- κ B (*Schütze et al., 1992; Ruiz-Ortega et al., 2000*).

Da viele fundamentale Erkenntnisse über die Wirkungsweise von AT₂-Rezeptoren *in vitro* aus kultivierten PC12W-Zellen gewonnen wurden, sei hier angemerkt, dass dieser Zelltyp ein seit langem etabliertes Modellsystem zur Untersuchung der neuronalen Differenzierung darstellt (*Greene und Tischler, 1982*). Diese aus dem Phäochromozytom der Ratte isolierten Zellen bilden unter Einfluss von NGF einen differenzierten Phänotyp aus und ähneln dann

sympathischen Nervenzellen. Da PC12W-Zellen bekanntermaßen reichlich AT₂-Rezeptoren, aber nur wenige bis keine AT₁-Rezeptoren exprimieren, eignen sie sich exzellent zur Untersuchung AT₂-Rezeptor-vermittelter Effekte auf neuronale Zellen.

Auch an dieser Zelllinie beschrieben Gallinat und Mitarbeiter (1997) eine AT₂-Rezeptor vermittelte Herunterregulation von Neurofilament NF-M, ein Neuronen-spezifisches Intermediärprotein, das am axonalen Wachstum beteiligt ist. Dies ist ein weiteres Beispiel, dass über den AT₂-Rezeptor nicht nur, wie in dem dieser Arbeit zugrunde liegenden pathophysiologischen Modell, Reaktionskaskaden unterstützt werden, die der Neuroregeneration Vorschub leisten, sondern, bei Vorhandensein von im Nettoeffekt insgesamt pro-apoptotischen Umständen, eben auch Apoptose vorangetrieben werden kann.

In diesem Zusammenhang muss auch erneut daran erinnert werden, dass die in einer speziellen kultivierten Zellpopulation *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse zwar für das Verständnis potentieller und detaillierter zellulärer Mechanismen, die über einen bestimmten Rezeptor-Typ vermittelt werden, eminent wichtig sind, dass jedoch ihre Übertragung auf andere Zellpopulationen oder gar komplexe Gegebenheiten wie spezielle pathophysiologische Bedingungen innerhalb spezieller Gewebe, die noch dazu *in vivo*, nicht ohne weiteres vorgenommen werden kann.

Schließlich sei bei den pro-apoptotischen Mechanismen der AT₂-Rezeptoren noch erwähnt, dass auch eine Überexpression des AT₂-Rezeptors an sich ein Signal für Apoptose darstellen kann und dass diese dann interessanterweise keine ANG II-Bindung am Rezeptor benötigen. In der zugrunde liegenden Untersuchung von Miura und Karnik (2000) wurden ANG II-abhängige und -unabhängige AT₂-Rezeptor-Signalwege, welche in der Regulation der Apoptose von kultivierten Fibroblasten, Epithelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen beteiligt sind, verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die AT₂-Rezeptor-Überexpression selbst ein Signal zum Absterben darstellte, welches nur durch Rezeptormutation bzw. pharmakologische Interzeption des Downstream-Signalflusses, wie z.B. die Hemmung von p38 MAPK oder Caspase-3, abgeschaltet werden konnte.

Auch außerhalb des Nervensystems existieren Hinweise auf einen AT₂-Rezeptor-vermittelten programmierten Zelltod. So konnten Studien an Granulosazellen der Eierstöcke der Ratte (Tanaka *et al.*, 1995) und an GN4 Leberepithelzellen zeigen, dass ANG II zur Aktivierung des Zelltod-signalisierenden JNK-Weges führte (Zohn *et al.*, 1995).

4.2.2.2.2 Der AT₁-Rezeptor und Apoptose

Im Gegensatz zum AT₂-Rezeptor sind die Signalwege, durch die der AT₁-Rezeptor Apoptose initiieren könnte, weniger genau beschrieben. So könnte die beschriebene, ANG II-induzierte und AT₁-Rezeptor-vermittelte Zunahme der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen durch Erhöhung des oxidativen Stresses an der Induktion von Apoptose beteiligt sein (*Jaimes et al., 1998*).

In einer Arbeit von Leri und Mitarbeitern (*2000*) konnte ferner gezeigt werden, dass auch die durch mechanischen Zug induzierte Apoptose in kultivierten Myozyten über den AT₁-Rezeptor vermittelt ist.

Weiterhin wurde berichtet, dass eine *in vitro* vermittelte AT₁-Rezeptor-Stimulation durch ANG II die p53-DNA-Bindungsaktivität zu steigern vermag, welche nachfolgend zur Hochregulation von pro-apoptotischen Bax-Genen führt. In diesem Modell schützten sowohl AT₁-Rezeptor-Antagonismus als auch eine ANG II-Antikörper-Administration vor p53-induzierter Apoptose (*Pierzchalski et al., 1997*).

Auch ein Proteinkinase C-abhängige Stimulation von Apoptose nach Aktivierung des AT₁-Rezeptors wurde postuliert (*Li D.Y. et al., 1998*).

Ruiz-Ortega und Mitarbeiter (*2000*) schließlich berichteten, dass die dem AT₂-Rezeptors zugeordnete Ceramid-vermittelte NF-κB-Aktivierung auch über AT₁-Rezeptoren induziert werden kann.

Der Beweis, dass Apoptose durch eine AT₁-Rezeptor-Aktivierung auch in neuronalen Zellen induziert werden kann, wurde erstmals in einer Arbeit jüngeren Datums erbracht. Desweiteren wurde in dieser Publikation auch anhand eines Schlaganfall-Modells, wie schon früher von anderen Autoren (*Dai et al., 1999*), gezeigt, dass eine medikamentöse Blockade der AT₁-Rezeptoren (und auch ein Knockout-Modell) eine erhebliche neuroprotektive Potenz im ZNS besitzt (*Walther et al., 2002*).

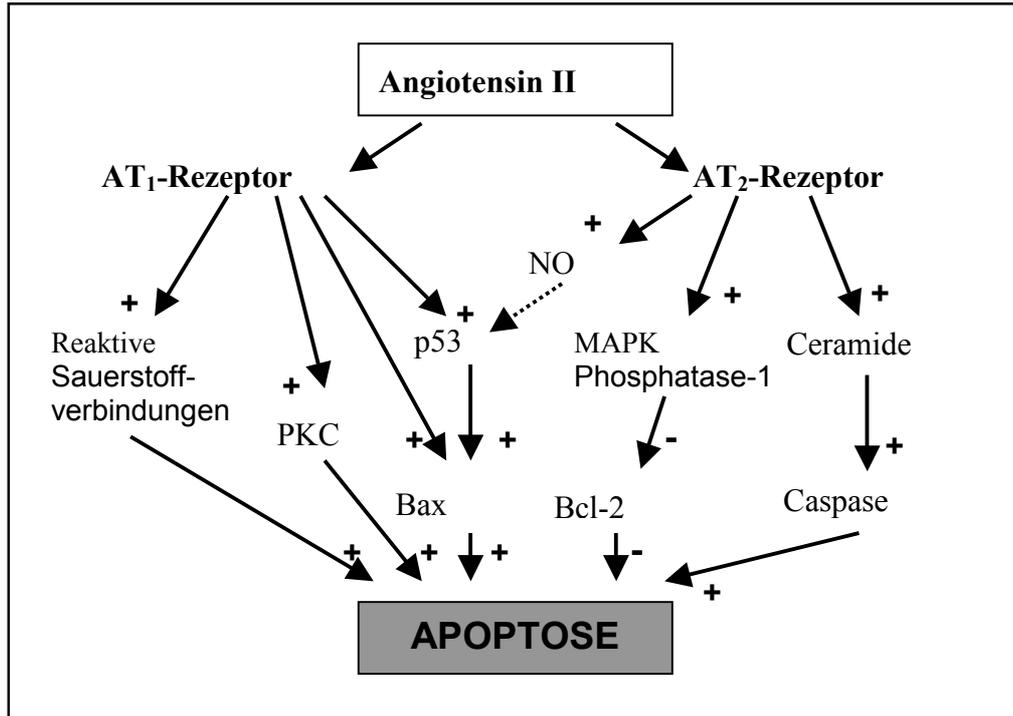


Abbildung 22: Schematisch vereinfachte Darstellung der vermuteten zellulären und molekularen Mechanismen, die einer ANG II-induzierten Apoptose über beide Rezeptorsubtypen zugrunde liegen können (modifiziert nach Bonnet et al., 2001).

Zu den oben erwähnten p53-abhängigen Aktivierung von Apoptose sollen an dieser Stelle noch einige Ausführungen gemacht werden. p53 ist ein Protein, das die Zellproliferation unterdrückt und den Zellzyklus anhält (Shankland und Wolf, 2000). Durch diese Mechanismen nimmt es bei der Initiierung der apoptotischen Kaskade eine Schlüsselfunktion ein (Shankland und Wolf, 2000). Es konnte sowohl für die Stimulation des AT₁-, als auch für die des AT₂-Rezeptors gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression des apoptosefördernden p53-Proteins hervorgerufen werden kann (Horiuchi et al., 1998; Morrissey und Klahr, 1999; Pierzchalski et al., 1997). Weiterhin wurde *in vitro* gezeigt, dass auch die Expression des Transkriptionsfaktors NF-κB durch AT₁- und AT₂-Rezeptoren vermittelt wird (Ruiz-Ortega, et al. 2000) und dass die Aktivierung von NF-κB hier eine Rolle in p53-vermittelter Apoptose spielt (Ryan et al., 2000). Des Weiteren ist es wahrscheinlich, dass p53 nicht nur ein ANG II-abhängiger Effektor bzw. Mechanismus von Apoptose ist, sondern auch selber eine Aktivierung des RAS verstärkt (Pierzchalski et al., 1997). Es ist nämlich in adulten Kardiomyozyten der Ratte gezeigt worden, dass p53 selber das lokale RAS durch Stimulation der transkriptionalen Aktivität der ANG II- und AT₁-Rezeptor-kodierenden

Gene verstärken kann. Wiederum kann nun eine p53-vermittelte ANG II-Bildung selber eine nachfolgend erneute p53-Bildung fördern und somit einen sich selbst unterhaltenden Circulus vitiosus vorantreiben (*Pierzchalski et al., 1997*).

NF- κ B stellt ein Schlüsselprotein dar, das eine apoptotische Antwort zu modulieren vermag. Es konnte eine Beteiligung an beiden Prozessen, dem Schutz vor Apoptose auf der einen Seite wie der Förderung von Apoptose auf der anderen gezeigt werden (*Ryan et al., 2000*). Hinweis auf eine nervenregenerationsfördernde Wirkung durch NF- κ B zeigten eigenen, auf dieser Dissertation aufbauenden Untersuchungen. Es konnte erstmals beschrieben werden, dass ANG II über den AT₂-Rezeptor die morphologische, axonale und im speziellen auch die funktionelle Nervenregeneration nach Läsion des N. ischiadicus signifikant beschleunigt, was gleichzeitig in dem hier verwendeten Modell der experimentellen Nervenläsion ganz wesentlich über die Aktivierung von NF- κ B in Schwann-Zellen mit nachfolgender Remyelinisierung vermittelt zu sein scheint. Dies konnte erstmals und eindeutig in kultivierten Schwann-Zellen, die mit ANG II-Lösung mit oder ohne PD 123319 oder Losartan inkubiert worden waren, in einer immunhistochemischen Färbung gegen NF- κ B und einem elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assay nachgewiesen werden (*Reinecke et al., 2003*). Zu unseren Befunden passen auch die eingangs erwähnten (Kapitel 1.3. *Pathophysiologie von AT₁- und AT₂-Rezeptoren am Nerven*) Beobachtungen von Nickols und Mitarbeitern (2003), die an myelinisierenden Schwann-Zellen von Ratten und Mäusen klar zeigen konnten, dass NF- κ B ein essentielles Signal für Schwann-Zellen darstellt, um eine axonale Myelinisierung voranzutreiben.

4.2.3 Modulation der Nervenregeneration durch die Extrazellulärmatrix

Eine Modulation der Extrazellulärmatrix stellt einen weiteren Mechanismus dar, über den AT₂-Rezeptoren die Neuroregeneration beeinflussen können. Von Astrozyten ist bekannt, dass sie Zelladhäsionsmoleküle, Proteoglykane, aber auch Extrazellulärmatrix (EZM)-Moleküle synthetisieren, die die axonale Regeneration beeinflussen. Während juvenile, permissive Astrozyten beispielsweise über die Expression von EZM-Molekülen wie Laminin und Fibronectin wachstumsfördernde Eigenschaften aufweisen, exprimieren die im Bereich der Gliaarbe vorkommenden adulten, inhibierenden Astrozyten neben bestimmten Proteoglykanen das EZM-Molekül Tenascin, welches das Axonwachstum inhibiert (*Snow et al., 1990*). Auch für die Entwicklung und Regeneration peripherer Nerven konnte gezeigt werden, dass die EZM-Moleküle von großer Bedeutung sind und in demyelinisierten Schwann-Zellen stark heraufreguliert sind (*Martini et al., 1994; Tona et al., 1993*).

Axone können über verschiedene Glykoproteine in der Zellmembran mit benachbarten Gliazellen bzw. EZM interagieren. Dazu zählen z.B. Integrine, Rezeptoren für Moleküle der EZM wie Laminin, Fibronectin und Tenascin. Durch Bindung eines Liganden wird in der Zielzelle bzw. im Axon eine Signalkaskade ausgelöst, die u.a. Veränderung im Zytoskelett hervorruft.

Eine durch ANG II induzierte axonale Elongation könnte auch teilweise darauf zurückzuführen sein, dass ANG II über AT₁- und AT₂-Rezeptoren die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix (EZM) beeinflusst. So konnten Fischer und Mitarbeiter (1996, 2001) an koronaren Endothelzellen der Ratte zeigen, dass die EZM-Moleküle Fibronectin, Laminin und Tenascin nach ANG II-Behandlung über beide Angiotensin-Rezeptorsubtypen reguliert werden. Es ist somit denkbar, dass ANG II über die Stimulation seiner beiden Rezeptorsubtypen über eine Veränderung der Extrazellulärmatrix günstigere Regenerationsbedingungen für die geschädigten Neurone schafft.

4.2.4 Modulation der Nervenregeneration durch Vaskularisierung

Aus einer Reihe von Studien ist bekannt, dass ANG II Vaskularisierungsprozesse induzieren kann. Es wäre daher theoretisch denkbar, dass eine verbesserte Blutversorgung für die beobachtete Verbesserung der AT₂-Rezeptor-vermittelten axonalen Regeneration verantwortlich war. Folgende Gründe sprechen jedoch gegen diese Hypothese:

1. Die AT₂-Rezeptor-vermittelte axonale Elongation wurde auch *in vitro* an Retina-Explantaten beobachtet (Lucius et al., 1998). Für diese kurzfristigen Effekte (3 Tage *in vitro*) kann eine Neovaskularisierung keine Rolle spielen.
2. In einer Studie von Fernandez und Mitarbeiter (1985) wurde zwar gezeigt, dass ANG II an der Cornea eine Vaskularisierung induzieren kann, aber diese Effekte konnten keinem der beiden Angiotensin-Rezeptorsubtypen zugeordnet werden. Munzenmeier und Greene (1996) konnten nachweisen, dass ANG II am Kremastermuskel angiogene Wirkungen über AT₁-Rezeptoren induziert, diese über AT₂-Rezeptoren jedoch inhibiert. Diese ANG II-induzierten angiogenen Effekte sind also AT₁-Rezeptor-vermittelt, während die hier beschriebene axonale Regeneration des N. ischiadicus ausschließlich AT₂-Rezeptor-vermittelt ist.
3. Le Noble und Mitarbeiter (1993) untersuchten ebenfalls die Effekte von ANG II auf das mikrovaskuläre Wachstum und beobachteten dabei, dass weder AT₁- noch AT₂-Rezeptoren an diesen Vorgängen beteiligt sind. Vielmehr schrieben die Autoren die Effekte einem bislang unbekanntem Angiotensin-Rezeptorsubtyp zu.

4. Wenn die AT₂-Rezeptor-vermittelte axonale Regeneration auf einer verbesserten Gefäßversorgung beruhen würde, würde man weder eine erhöhte GAP-43-Expression noch eine axonale Elongation über die Glianarbe hinaus finden, sondern lediglich eine größere Anzahl überlebender Neurone.

5. Außer diesen Argumenten implizieren eigene, auf diesen Daten aufbauende Versuche in den Schwann-Zellen der myelinisierenden Neurone im hier verwendeten Modell eine signifikante Rolle für NF-κB (*Reinecke et al., 2003*), das ein essentielles Signal für Schwann-Zellen darstellt, um eine axonale Myelinisierung voranzutreiben (*Nickols et al. 2003*).

Insgesamt darf also hier von einer primären AT₂-Rezeptor-vermittelten neuronalen Regeneration nach N. ischiadicus-Verletzung und nicht von einem sekundären durch Angiogenese vermittelten Effekt ausgegangen werden.

4.2.5 Maximale Nervenregeneration bei verlängerten ANG II-Applikation

Um die Frage nach dem absolut möglichen Ausmaß der AT₂-Rezeptor-vermittelten Nervenregeneration am N. ischiadicus zu klären, wurde der Einfluß einer zeitlich verlängerten ANG II-Applikation untersucht (*3.2.1.5 Einfluss einer zeitlich verlängerten ANG II-Applikation*). Hierdurch sollte der Frage nachgegangen werden, ob und inwieweit ANG II die AT₂-Rezeptor-vermittelte Nervenregeneration nicht nur beschleunigt, sondern auch in ihrer maximal mögliche Ausprägung verbessern würde, wenn zeitlich verlängerte Behandlungsintervalle miteinander verglichen würden.

Es zeigte sich, dass nach einer Behandlungsdauer von 32 Tagen der maximal mögliche Regenerationseffekt in der Fußspannanalyse (im Vergleich zu gesunden Tieren hatten sich die Zehenabstände fast vollständig normalisiert) bereits erreicht war. Darüber hinaus konnte weder durch Placebo (physiologische Kochsalz-Lösung), noch durch ANG II (10⁻¹¹ mol/l) eine weitere Verbesserung erreicht werden. In dem hier untersuchten Modell kann daher davon ausgegangen werden, dass durch ANG II zwar eine Regenerationsbeschleunigung, nicht aber eine absolute Verbesserung der maximal wiedererlangbaren Funktionalität erreicht werden kann. Einschränkend muss zu dieser Interpretation jedoch angemerkt werden, dass hier auch in der zu vergleichenden Placebogruppe eine nahezu vollständige Regeneration beobachtet werden konnte. Zur genaueren Klärung einer potentiell möglichen Verbesserung der Neuroregeneration unter ANG II-Administration müsste daher ein Modell bzw. Parameter herangezogen werden, in dem sich unter Placebo-Behandlung keine vollständige restitutio ad integrum ausbildet.

Eine Verkürzung der Regenerationszeit, wie sie durch ANG II-Behandlung erzielt werden konnte, könnte in verbesserten Heilungschancen resultieren, da die Gefahr von Atrophie und Degeneration der betroffenen sensorischen und motorischen Endorgane infolge andauernder Denervation entgegen gewirkt werden könnte.

5. Zusammenfassung

ANG II, das wichtigste Effektorpeptid des Renin-Angiotensin Systems, vermittelt seine vasokonstriktorisches und proliferationsfördernden Effekte vor allem über den AT₁-Rezeptor. Bezüglich des in seiner Funktionsweise weit weniger bekannten zweiten ANG II Rezeptortyps, des AT₂-Rezeptors, gab es Hinweise auf eine Beteiligung an neuronalen Regenerationsprozessen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluß ANG II insbesondere seiner Rezeptoren AT₁- und AT₂ auf die funktionelle Regeneration peripherer Nerven am Modell der experimentellen Läsion des N. ischiadicus der Ratte. Da dies noch nie zuvor *in vivo* untersucht worden war, wurde zunächst ein geeignetes tierexperimentelles Modell etabliert.

Nach operativer Quetschläsion des N. ischiadicus erfolgte durch einen mit einer subkutan implantierten osmotischen Minipumpe verbundenen Polyethylen-Schlauch eine kontinuierliche und gleichmäßige lokale Applikation der Wirkstoffe in definierter Konzentration direkt an der Läsionsstelle. Vom 10. und 17. Tag bis zum 20. Tag post laesionem wurden nun an allen Tieren täglich mittels zweier funktioneller Untersuchungsmethoden, der Fußspannanalyse und dem Elektrostimulationstest der Fußsohle, der Regenerationsverlauf verfolgt.

Es zeigte sich gegenüber physiologischer Kochsalz-Lösung eine konzentrationsabhängige signifikante Regenerationsverbesserung durch ANG II, wobei sich eine Konzentration von 10¹¹ mol/l am effektivsten erwies und höhere Konzentrationen entweder weniger neurotroph (10⁹ mol/l) bzw. einer Nervenregeneration sogar entgegen wirkten (10⁻⁷ mol/l). In einer zusätzlich Gruppe mit verlängertem Behandlungs- und Beobachtungsintervall von 32 Tagen wurde deutlich, dass es sich bei dem beobachteten neurotrophen ANG II-Effekt eher um eine Beschleunigung, nicht aber um eine Verbesserung der maximal erreichbaren funktionellen Regeneration handelt.

Um die beobachteten Effekte den beiden ANG II-Rezeptortypen, AT₁- und AT₂-Rezeptoren, gezielt zuordnen zu können, wurden zudem der selektive AT₁-Rezeptorantagonist Losartan und der AT₂-Rezeptorantagonist PD 123319 allein und jeweils in Kombination mit der effektivsten Dosierung von ANG II verabreicht. Dies verdeutlichte, dass die beobachteten neurotrophen Effekte von ANG II AT₂-Rezeptor-vermittelt waren, denn sie konnten vollständig durch eine AT₂-Rezeptor-Blockade, nicht aber durch eine AT₁-Rezeptor-Blockade, die ebenfalls die Nervenregeneration beschleunigte, unterbunden werden.

Am Ende des Versuchprotokolls wurden Schnitte des N. ischiadicus mittels computergestützter morphometrischer Analyse der Axone und Myelinscheiden durch Elektronenmikroskopie und Myelinscheidenfärbung mit Paraphenyldiamin, Analyse von Qualität und Quantität der regenerierten Nervenfasern, Bestimmung des Myelinisierungsgrades sowie mittels immunhistochemischer Färbung gegen „growth associated protein“ (GAP-43, ein Marker für neuaussprossende Nervenfasern) morphologische Untersuchungen durchgeführt. Auch durch diese morphologische Analyse der Nervenregeneration konnte bestätigt werden, dass ANG II als neurotropher Faktor AT₂-Rezeptor-vermittelt die Nervenregeneration beschleunigen kann.

Zum ersten Mal konnte durch die vorliegenden Daten *in vivo* funktionell und morphologisch gezeigt werden, dass ANG II in peripheren Nerven als neurotropher Faktor über AT₂-Rezeptoren regenerationsfördernd wirkt und dass somit zumindest ein Teil der auch durch den AT₁-Rezeptor-Antagonisten vermittelten Regenerationsbeschleunigung über diesen Rezeptor vermittelt wird.

Dieses Ergebnis ist potentiell von großer klinischer Relevanz, da es die bereits seit längeren bestehende Annahme untermauert, dass AT₁-Rezeptor-Antagonisten ihre organoprotektiven Eigenschaften nicht nur bei neuronaler Regeneration, sondern auch bei Erkrankungen des kardiovaskulären Formenkreises, wegen derer diese Substanzklasse in den letzten Jahren schnell wachsende Verbreitung gefunden hat, zu einem bedeutenden Anteil auch über den nicht blockierten AT₂-Rezeptor entfalten.

Weitere gezielte Experimente sind notwendig, um abzuschätzen, ob für die Substanzklasse der AT₁-Rezeptor-Antagonisten auch tatsächlich im klinischen Alltag eine Indikationserweiterung für Nervenregeneration/Neuroprotektion zukommen wird, oder ob dieser Pathomechanismus gar eine Einsatzmöglichkeit für selektive AT₂-Rezeptor-Agonisten darstellen könnte.

Summary

The established actions of ANG II, the main effector peptide of the renin-angiotensin-system within blood pressure control and body fluid homeostasis have been clearly assigned to the AT₁-receptor. Less is known about the physiological role of AT₂ receptors. In the last few years, a growing body of evidence has indicated that this receptor is involved in cellular programs of neuronal regeneration

Therefore In this study investigated the possible supportive role of ANG II in the maintenance of function and regeneration of peripheral neurons after sciatic nerve crush.

Sciatic nerves of anaesthetized rats were unilaterally crushed. Local administration of substances at the site of peripheral nerve lesion was performed by osmotic minipumps and a connecting catheter with its distal end facing the nerve crush. The osmotic minipump and its catheter were placed subcutaneously in the abdominal region of the rat. Chronic local treatment for two weeks was commenced at the time of crush. Nerve regeneration was assessed using footprint analysis at day 17 until day 20 and by testing the return of sensory/motoric function by a locally applied electrical stimulus starting at day 10.

On day 20 following nerve crush ANG II-treated animals demonstrated an increase of nerve regeneration which was most visible at a concentration of 10⁻¹¹M. At 10⁻⁹M, ANG II also enhanced toe spread distance although to a slightly lesser extend, while at 10⁻⁷M ANG II had no effect on nerve regeneration. To clarify whether ANG II enhances or rather accelerated functional recovery in this experimental model, a long-term study was performed over 32 days. This sub-study showed that treatment with ANG II accelerated but did not enhance nerve regeneration. After 32 days, values for footprints of both groups, ANG II (10⁻¹¹ M) and saline, were identical.

The effects of exogenous applied ANG II were completely abolished by co-administration of the AT₂ receptor antagonist, PD 123319 (10⁻⁷M), reducing the regenerative response to that of the saline control group, while the AT₁ receptor antagonist, losartan (10⁻⁷M), did not reduce the regenerative response. The combination of both receptor antagonists at the described concentration plus ANG II(10⁻¹¹M) had no accelerating effect on nerve regeneration. Single treatment with the AT₂ receptor antagonist, PD 123319 (10⁻⁷M), completely antagonized the nerve regeneration, while the AT₁ receptor antagonist, losartan (10⁻⁷M), had no effect.

The differences in functional recovery were reflected in the morphological appearance of the sciatic nerves 10 mm distal to the nerve lesion site on day 20 after nerve crush.

The effect of ANG II was lost in the presence of PD 123319, but not of losartan, focusing on an AT₂ receptor-mediated effect. This data could be confirmed on the electron microscopic level, by morphometric analysis of axonal diameters and myelin sheath thickness, and by GAP-43 staining in the sciatic nerve on day 20 after nerve crush

The salient finding of the present study is the observation that ANG II via its AT₂ receptor accelerates axonal regeneration and the functional recovery in adult rats following sciatic nerve crush. The present results extend previous *ex vivo* observations that ANG II acts as a neurotrophic factor through its AT₂ receptor and, furthermore, provide first functional evidence for the regenerative ability of ANG II through its AT₂ receptor.

In this context it is also of interest to note that inhibition of the AT₁ receptor per se enhances regeneration. The findings on the neurotrophic action of the AT₂ receptor may provide a basis for the design of new, receptor-directed, therapeutic concepts for the treatment of human peripheral nerve injuries or for preventing secondary damage in consequence of chronic disease, e.g. diabetic neuropathy. The clinical relevance of this approach becomes already apparent with the increasing use of AT₁ receptor antagonists, part of the organ-protective actions of these drugs might be ascribed to an agonistic action of ANG II at the AT₂ receptor site.

6. Literaturverzeichnis

Aguayo A.J. (1985)

[Sar¹] angiotensin II receptor-mediated stimulation of protein synthesis in chick heart cells.
Am J Physiol 258: H806-H813

Aigner L., Arber S., Kapfhammer J.B., Laux T., Schneider C., Botteri F., Brenner H.R. und Caroni P. (1995)

Overexpression of the neuronal growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice.
Cell 83: 219-230

Aubert I., Ridet J.L. und Gage F.H. (1995)

Regeneration in the adult mammalian CNS: guided by development.
Curr Opin Neurobiol 5: 625-635

Baichwal R.R., Bigbee J.W. und de Vries G.H. (1988)

Macrophage-mediated myelin-related mitogenic factor for cultured Schwann cells.
Proc Natl Acad Sci USA 85: 1701-1705

Bain J.R., Mackinnon S.E. und Hunter D.A. (1989)

Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat.
Plast Reconstr Surg 83: 129-138

Baker K.M. und Aceto J.F. (1990)

Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells.
Am J Physiol 249: H610-H618

Barrett G.L. und Georgiou A. (1996)

A low affinity nerve growth factor receptor P75NGFR mediates death of PC12 cells after nerve growth withdrawal.
J Neurosci Res 45(2): 117-28

Bedecs K., Elbaz N., Sutren M., Masson M., Susini C., Strosberg A.D. und Nahmias C. (1997)

Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase.
Biochem J 325: 449-454

Bernstein K.E., Martin B.M., Bernstein E.A., Linton J., Striker L. und Striker G. (1988)

The isolation of angiotensin-converting enzyme cDNA.
J Biol Chem 263 (23): 11021-11024

Bijlsma W.A., Jennekens F.G.I., Shotman P. und Gipsen W.H. (1984)

Neurotrophic factors and regeneration in the peripheral nervous system.
Psychoneuroendocrinology 9(3): 199-215

- Bleuel A., de Gasparo M., Whitebread S., Puttner I. und Monard D. (1995a)**
Regulation of protease nexin-1 expression in cultured Schwann cells is mediated by angiotensin II receptors.
J Neurosci 15: 750-761
- Bleuel A. und Monard D. (1995b)**
Regulation of protease nexin-1 expression and angiotensin II receptor subtype 1 expression: inverse relationship in experimental models of nerve injury.
J Neurosci Res 42: 562-570
- Blöchl A. (2001)**
Aspekte des Nervenwachstumsfaktor NGF und andere Neurotrophine.
Neuroforum 2/01: 35-45
- Blume A., Funk A., Gohlke P. und Unger T. (2000)**
AT₂ receptor inhibition in the rat brain reverses the beneficial effects of AT₁ receptor blockade on neurological outcome after focal brain ischemia.
Hypertension 36: W1.03, p. 356 [Abstract]
- Blume A., Kaschina E. und Unger T. (2001)**
Angiotensin II type 2 receptors: signaling and pathophysiological role.
Curr Opin Nephrol Hypertens 10: 239-246
- Bohm K.J., Vater W., Steinmetzer P., Kusnetsov S.A., Rodionov V.I., Gelfand V.I. und Unger E. (1990)**
Effect of MAP 1, MAP 2, and tau-proteins on structural parameters of tubulin assemblies.
Acta Histochem 39 (Suppl): 357-364
- Bonnet F., Cao Z. und Cooper M.E. (2001)**
Apoptosis and Angiotensin II: Yet another renal regulatory system?
Exp Nephrol 9: 295-300
- Book A.A., Fischer I., Yu X.J., Lannuzelli P. und Murphy E.H. (1996)**
Altered expression of microtubule-associated proteins in cat trochlear motoneurons after peripheral and central lesions of the trochlear nerve.
Exp Neurol 138: 214-226
- Bottari S.P., Taylor V., King I.N., Bogdal Y., Whitebread S. und de Gasparo M. (1991)**
AT₂ angiotensin II receptors do not interact with guanine nucleotide binding proteins.
Eur J Pharmacol 207: 157-163
- Bozyczko D. und Horwitz A.F. (1986)**
The participation of a putative cell surface receptor for laminin and fibronectin in peripheral neurite extension.
J Neurosci 6: 1241-1251
- Brown D.G., Sun X. und Cohen G.M. (1993)**
Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation.
J Biol Chem 268: 3037-3039

- Buisson B., Bottari S.P., de Gasparo M., Gallo-Payet N. und Payet M.D. (1992)**
The angiotensin AT₂ receptor modulates T-type calcium current in non-differentiated NG108-15 cells.
FEBS Lett 309: 161-164
- Buisson B., Laflamme L., Bottari S.P., de Gasparo M., Gallo-Payet N. und Payet M.D. (1995)**
A G-protein is involved in the angiotensin AT₂ receptor inhibition of the T-type Ca²⁺ current in non-differentiated NG 108-15 cells.
J Biol Chem 270: 1670-1674
- Bumpus F.M., Pucell A.G., Daud A.I. und Husain A. (1988)**
Angiotensin II: an intraovarian regulatory peptide.
Am J Med Sci 295 (4): 406-408
- Bumpus F.M., Catt K.J. und Chiu A.T. (1991)**
Nomenclature for angiotensin receptors: a report of the nomenclature committee of the Council for High Blood Pressure Research.
Hypertension 17: 720-722
- Campbell D.J. und Habener J.F. (1986)**
Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat brain.
J Clin Invest 78: 31-39
- Campbell D.J. (1987)**
Circulating and tissue angiotensin systems.
J Clin Invest 79: 1-6
- Campenot R.B. (1981)**
Regeneration of neurites in long-term cultures of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor.
Science 214: 579-581
- Cao Z., Kelly D.J., Cox A., Casley D., Forbes J.M., Martinello P., Dean R., Gilbert R.E. und Cooper M.E. (2000)**
Angiotensin type 2 receptor is expressed in the adult rat kidney and promotes cellular proliferation and apoptosis.
Kidney Int 58(6): 2437-2451
- Chamoux E., Breault L., Lehoux J.G. und Gallo-Payet N. (1999)**
Involvement of the angiotensin II type 2 receptor in apoptosis during human fetal adrenal gland development.
J Clin Endocrinol Metab 84: 4722-4730
- Chappell M.C., Diz D.I. und Jacobsen D.W. (1992)**
Pharmacological characterization of angiotensin II binding sites in the canine pancreas.
Peptides 13: 313-318

Chen Y.S., Wang-Bennet L.T. und Coker N.J. (1989)

Facial nerve regeneration in the silicone chamber: the influence of nerve growth factor.
Exp Neurol 103: 52-60

Chiu A.T., Mc Call D.E., Price W.A., Wong P.C., Carini D.J., Duncia J.V., Wexler R.R., Yoo S.E., Johnson A.L. und Timmermans P.B.M.W.M. (1990)

Nonpeptide ANG II receptor antagonists. VII. Cellular and biochemical pharmacology of DuP 753, an orally active antihypertensive agent.
J Pharmacol Exp Ther 252: 711-718

Choi B.H., Kim R.C., Vaughan P.J., Lau A., van Nostrand W.E., Cotman C.W. und Cunningham D.D. (1995)

Decreases in protease nexin in Alzheimer's disease brain.
Neurobiol Aging 16: 557-562

Clemens G., Korfhage C. und Müller H.W. (1997)

Gene expression in nerve regeneration.
Neuroscientist by Williams & Wilkins, ISSN 1073-8584

Cochard P. und Paulin D. (1984)

Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo.
J Neurosci 4: 2080-2094

Cote F., Do T.H., Laflamme L., Gallo J.M. und Gallo-Payet N. (1999)

Activation of the AT₂ receptor of angiotensin II induces neurite outgrowth and cell migration in microexplant cultures of the cerebellum.
J Biol Chem 274: 31686-31692

Crackower M.A., Sarao R., Oudit G.Y., Yagil C., Koziaradzki I., Scanga S.E., Oliverados-Santos A.J., da Costa J., Zhang L., Pei Y., Scholey J., Ferrario C.M., Manoukian A.S., Chappell M.C., Backx P.H., Yagil Y. und Penninger J.M. (2002)

What Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function.
Nature 417: 822-828

Cragg B.G. (1970)

What is the signal for chromatolysis?
Brain Res 23: 1-21

Culman J., Höhle S., Qadri F., Edling O., Blume A., Lebrun C. und Unger T. (1998)

Angiotensin as neuromodulator/neurotransmitter in central control of body fluid and electrolyte homeostasis.
Clin Exp Hypertens 17: 281-293

Dai W.J., Funk A., Herdegen T., Unger T. und Culman J. (1999)

Blockade of central angiotensin AT(1) receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats.
Stroke 30: 2391-2398

Danser A.H.J. (1996)

Local renin-angiotensin systems
Mol Cell Biochem 157: 211-216

de Gasparo M. und Siragy H.M. (1999)

The AT₂ receptor: Fact, fancy and fantasy.
Regul Pept 81: 11-24

de Gasparo M., Catt K.J., Inagami T., Wright J.W. und Unger T. (2000)

International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors.
Pharmacol Rev 52: 415-472

de Koning P., Brakkee J.H. und Gispen W.H. (1986)

Methods for producing a reproducible crush in the sciatic and tibial nerve of the rat and rapid and precise testing of return of sensory function: beneficial effects of melanocortins.
J Neurol Sci 74: 237-256

de Medinaceli L., Freed W. und Wyatt R. (1982)

An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks.
Exp Neurol 77: 634-643

Dellon A.L. und Mackinnon S.E. (1989)

Selection of the appropriate parameter to measure neural regeneration.
Ann Plast Surg 23: 197-202

Derby A., Engleman V.W., Friedich G.E., Neises G., Rapp S.R. und Roufa D.G. (1993)

Nerve growth factor facilitates regeneration across nerve gaps: morphological and behavioral studies in rat sciatic nerve.
Exp Neurol 119: 176-191

Dimmeler S., Rippmann V., Weiland U., Haendeler J. und Zeiher A.M. (1997)

Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide.
Circ Res 81: 970-976

Dol F., Martin G., Staels B., Mares A.M., Cazaubon C., Nisato D., Bidouard J.P., Janiak P., Schaeffer P. und Herbert J.M. (2001)

Angiotensin AT₁ receptor antagonist irbesartan decreases lesion size, chemokine expression, and macrophage accumulation in apolipoprotein E-deficient mice.
J Cardiovasc Pharmacol 38(3):395-405

Donoghue M., Hsieh F., Baronas E., Godbout K., Gosselin M., Stagliano N., Donovan M., Woolf B., Robison K., Jeyaseelan R., Breitbart R.E. und Acton S. (2000)

A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9.
Circ Res 87: e1-e9

Dragunow M., Young D., Hughes P., MacGibbon G., Lawlor P., Singleton K., Sirimanne E., Beilharz E. und Gluckman P. (1993)

Is c-Jun involved in nerve cell death following status epilepticus and hypoxic-ischemic brain injury?

Brain Res Mol Brain Res 18: 347-352

Dudley D.T. und Summerfelt R.M. (1993)

Regulated expression of angiotensin II (AT₂) binding sites in R3T3 cells.

Regul Pept 44: 199-206

Dzau V.J. (1988a)

Cardiac renin-angiotensin system. Molecular and functional aspects.

Am J Med 84: 22-27

Dzau V.J. (1988b)

Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis.

Circulation 77: 14-23

Eckert H.G. (1976)

Radioimmunoassay.

Angew Chem Int Ed Engl 15 (2): 525-533

Elton T.S. (1995)

The sequence and the genomic organisation of the human type 2 angiotensin II receptor.

Biochem Biophys Res Commun 209: 554-565

Erdős E.G. (1990)

Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the year.

Hypertension 16: 363-370

Estable-Puig J.F., Bauer W.C. und Blumberg J.M. (1965)

Technical note: paraphenylenediamine staining of osmium-fixed, plastic-embedded tissue for light and phase microscopy.

J Neuropathol Exp Neurol 24: 531-535

Estus S., Zaks W.J., Freeman R.S., Gruda M., Bravo R. und Johnson E.M. (1994)

Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis.

J Cell Biol 127: 1717-1727

Fawcett J.W. und Keynes R.J. (1990)

Peripheral nerve regeneration.

Annu Rev Neurosci 13: 43-60

Feral C., Le Gall S. und Leymarie P. (1995)

Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: its possible role in atresia.

Eur J Endocrinol 133: 747-753

Fernandez L.A., Twickler J. und Mead A. (1985)

Neovascularization produced by angiotensin II.
J Lab Clin Med 105: 141-146

Fernandez E., Pallini R. und Mercanti D. (1990)

Effects of tropically administered nerve growth factor on axonal regeneration in peripheral nerve autographs implanted in the spinal cord of rats.
Neurosurgery 26: 37-42

Fischer J.W., Stoll M. und Unger T. (1996)

Thrombospondin mRNA expression is increased in endothelial cells following stimulation of AT₂ receptors.
J Vasc Res 33: 26

Fischer J.W., Stoll M., Hahn A.W.A. und Unger T. (2001)

Differential regulation of thrombospondin-1 and fibronectin by angiotensin II receptor subtypes in endothelial cells in vitro.
Cardiovasc Res 51(4): 784-791

Fyhrquist F.Y., Forslund T., Tikkanen I. und Grönhagen-Riska C. (1980)

Induction of angiotensin-I converting enzyme in rat lung with captopril SQ 14225.
Eur J Pharmacol 67: 473-475

Gallinat S., Csikos T., Meffert S., Herdegen T., Stoll M. und Unger T. (1997)

The angiotensin AT₂ receptor down-regulates neurofilament M in PC12W cells.
Neurosci Lett 277: 29-32

Gallinat S., Yu M., Dorst A., Unger T. und Herdegen T. (1998)

Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of angiotensin AT₂ and AT₁ receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves.
Brain Res 57: 111-122

Gallinat S., Busche S., Schütze S., Kröhnke M. und Unger T. (1999)

AT₂ receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells.
FEBS Lett 443: 75-79

Gallo G., Lefcort F.B. und Letourneau P.C. (1997)

The trkA receptor mediates growth cone turning toward a localized source of nerve growth factor.
J Neurosci 17(14): 5445-5454

Gasc J.M., Shanmugan S., Schutz S. und Corvol P. (1996)

Ontogeny of AT₂ receptors. Recent advances in AT₂ receptors.
Meeting in New York, NY, USA, 19.05.1996

Gehlert D.R., Gachenheimer S.L. und Schober D.A. (1991)

Autoradiographic localization of subtypes of angiotensin II antagonist binding in the rat brain.
Neurosci 44: 501-514

Gendron L., Laflamme L., Rivard N. Asselin C., Payet M.D. und Gallo-Payet N. (1999)
Signal from the AT₂ (angiotensin type 2) receptor of angiotensin II inhibit p21ras and activate MAPK (mitogen-activated protein kinase) to induce morphological neuronal differentiation in NG108-15 cells.

Mol Endocrinol 13: 1615-1626

Gillen C., Korfhage C. und Müller H.W. (1997)

Gene expression in nerve regeneration.

Neuroscientist 3: 112-122

Gohlke P., Bünning P. und Unger T. (1992)

Distribution and metabolism of angiotensin I and II in the blood vessel wall.

Hypertension 20: 151-157

Gohlke P., Pees C. und Unger T. (1998)

AT₂ receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism.

Hypertension 31(1 Pt 2): 349-355

Gold B.G., Mobley W.C. und Matheson S.F. (1991)

Regulation of axonal caliber, neurofilament content, and nuclear localization in mature sensory neurons by nerve growth factor.

J Neurosci 11: 943-955

Gold B.G. und Spencer P.S. (1993)

Neurotrophic function in normal nerve and in peripheral neuropathies.

Gorio A. editor. Neuroregeneration. New York: Raven Press, 101-122

Goldstein M.E., Weiss S.R., Lazzarini R.A., Shneidman P.S., Lees J.F. und Schlaepfer W.W. (1988)

mRNA levels of all three neurofilament proteins decline following nerve transection.

Brain Res 427: 287-291

Goto M., Mukoyama M., Suga S., Matsumoto T., Nakagawa M., Ishibashi R., Kasahara M., Sugawara A., Tanaka I. und Nakao K. (1997)

Growth-dependent induction of angiotensin II type 2 receptor in rat mesangial cells.

Hypertension 30: 358-362

Grady E.F., Sechi L.A., Griffin C.A., Schambelan M. und Kalinyak J.E. (1991)

Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus.

J Clin Invest 88: 921-933

Grafstein B. und Mc Quarrie I.G. (1978)

In Neuronal Plasticity, ed. C.W. Cotman, pp. 155-195. New York: Raven

Greene L.A. and Tischler A.S. (1982)

PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research.

Adv Cell Neurobiol 3: 373-414

Griffin S.A., Brown W.C., MacPherson F., McGrath J.C., Wilson V.G., Korsgaard N., Mulvany M.J. und Lever A.F. (1991)

Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism.
Hypertension 17: 626-635

Grothe C. und Nikkhah C. (2001)

The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration.
Anat Embryol 204(3): 171-177

Gross F. (1965)

Renin-angiotensin system and hypertension.
Wien Klein Wochenschr 77(37): 611-614

Gurwitz D. und Cunningham D.D. (1988)

Thrombin modulates and reverses neuroblastoma neurite outgrowth.
Proc Natl Acad Sci USA 85: 3440-3444

Hackenthal E., Paul M., Ganten D. und Taugner R. (1990)

Morphology, physiology and molecular biology of renin secretion.
Physiol Rev 70: 1067-1116

Hagg T., Gulati A.K., Behzadian M.A., Vahlsing H.L., Varon S. und Manthorpe M. (1991)

Nerve growth factor promotes CNS cholinergic axonal regeneration into acellular peripheral nerve grafts.
Exp Neurol 112: 79-88

Hansson H.A., Dahlin L.B. und Danielsen N. (1986)

Evidence indicating trophic importance of IGF-1 in regenerating peripheral nerves.
Acta Physiol Scand 126: 609-614

Hein L., Meinel L., Pratt R.E., Dzau V.J. und Kobilka B.K. (1997)

Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT₁ and AT₂ receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand.
Mol Endocrinol 11: 1266-1277

Herdegen T., Skene P. und Bähr M. (1997)

The c-Jun transcription factor – bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration.
Trends Neurosci 20: 227-231

Herdegen T., Claret F.X., Kallunki T., Martin-Villalba A., Winter C., Hunter T. und Karin M. (1998)

Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury.
J Neurosci 18: 5124-5135

Heumann R., Korsching S., Bandtlow C. und Thoenen H. (1987)

Changes in nerve growth factor synthesis in non-neuronal cells in response to sciatic nerve transection.

J Cell Biol 104: 1623-1631

Hoffman P., Cleveland D., Griffin J., Landes P., Cowan N. und Price D. (1987)

Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber.

Proc Natl Acad Sci USA 84: 3472-3476

Hoffman P.N., Pollock S.C. und Striph G.G. (1993)

Altered gene expression after optic nerve transection. Reduced neurofilament expression as a general response to axonal injury.

Exp Neurol 119: 32-36

Horiuchi M., Hayashida W., Kambe T., Yamada T. und Dzau V.J. (1997)

Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis.

J Biol Chem 272: 19022-19026

Horiuchi M., Akishita M. und Dzau V.J. (1998)

Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis.

Endocr Res 24: 307-314

Horiuchi M., Akishita M. und Dzau V.J. (1999)

Recent progress in Angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system.

Hypertension 33: 613-621

Houenou L.J., Turner P.L., Li L., Oppenheim R.W. und Festoff B.W. (1995)

A serine protease inhibitor, protease nexin-1, rescues motoneurons from naturally occurring and axotomy-induced cell death.

Proc Natl Acad Sci USA 92: 895-899

Hsueh W.A., Carlson E.J. und Israel-Hagman E. (1981)

Mechanism of acid activation of renin: role of kallikrein in kinin activation.

Hypertension 3 (Suppl I): 122-129

Huang X.C., Richards E.M. und Summers C. (1996)

Mitogen activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibit by angiotensin II type 2 receptors.

J Biol Chem 271: 15635-15641

Ichiki T., Labolsky P.A. und Shiota C. (1995)

Effects on blood pressure and exploratory behavior of mice lacking angiotensin II type 2 receptor.

Nature 377: 748-750

Inagami T., Nakamaru M., Mizuno K. und Higashimori K. (1988)

Conceptual evolution of renin research.

Clin Exp Hypertens 10: 1129-1139

Ip Y.T. und Davis R.J. (1998)

Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development.

Current Opinion in Cell Biology 10: 205-219

Jaimes E.A., Galceran J.M. und Raij L. (1998)

Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells.

Kidney Int 54: 775-784

Jeunemaitre X., Lifton R.P., Hunt S.C., Williams R.R. und Lalouel J.M. (1992)

Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension.

Nat Genet 1: 72-75

Jiang Y.Q., Pickett J. und Oblinger M.M. (1994a)

Long-term effects of axotomy on beta-tubulin and NF gene expression in rat DRG neurons.

J Neural Transplant Plast 5: 103-114

Jiang Y.Q., Pickett J. und Oblinger M.M. (1994b)

Comparison of changes in beta-tubulin and NF gene expression in rat DRG neurons under regenerative-permissive and regeneration-prohibitive conditions.

Brain Res 637: 233-241

Jiao H., Cui X.L., Torti M., Chang C.H., Alexander L.D., Lapetina E.G. und Douglas J.G. (1998)

Arachidonic acid mediates angiotensin II effects on p21ras in renal proximal tubular cells via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway.

Proc Natl Acad Sci U S A 95(13):7417-21

Johnson E.M., Rich K.M. und Yip H.K. (1986)

The role of NGF in sensory neurons in vivo.

Trends Neurosci 9: 33-37

Junqueira L.C. und Carneiro J. (1991)

Histologie.

Springer-Verlag pp 275; ISBN 3-540-53733-3

Kakar S.S., Sellers J.C., Devor D.C., Musgrove L.C. und Neill J.D. (1992)

Angiotensin II type-1 receptor cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation.

Biochem Biophys Res Commun 183: 1090-1096

Kakuchi J., Ichiki T., Kiyama S., Hogan B.L.M., Fogo A., Inagami T. und Ichikawa I. (1995)

Developmental expression of renal angiotensin receptor gene in the mouse.

Kidney Int 47: 140-147

Kambayashi Y., Bardhan S., Takahashi K., Tsuzuki S., Inui H., Hamakubo T. und Inagami T. (1993)

Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition.

J Biol Chem 268: 24543-24546

Kang J., Sumners C. und Posner P. (1992)

Modulation of net outward current in cultured neurons by angiotensin II: involvement of AT₁ and AT₂ receptors.

Brain Res 580: 317-324

Kang J., Sumners C. und Posner P. (1993)

Angiotensin type 2 receptor-modulated changes in potassium currents in cultured neurons.

Am J Physiol 265: C607-C616

Kang J., Richards E.M., Posner P. und Sumners C. (1995)

Modulation of the delayed rectifier K⁺ current in neurons by angiotensin II type 2 receptor fragment.

Am J Physiol 268: C278-C282

Kanje M., Skottner A., Sjoberg J. und Lundborg G. (1989)

Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve.

Brain Res 486: 396-398

Karns L.R., Ng S.C., Freeman J.A. und Fishman M.C. (1987)

Cloning of complementary DNA for GAP-43, a neuronal growth-related protein.

Science 236: 597-600

Kaschina E. und Unger T. (2003)

Angiotensin AT₁/AT₂ receptor regulation, signalling and function.

Blood Press 12(2): 70-88

Kataoka A., Kubota M., Wakazono Y., Okuda A., Bessho R., Lin W., Usami I., Akiyama Y. und Furusho K. (1995)

Association of high molecular weight DNA fragmentation with apoptotic or non-apoptotic cell death induced by calcium ionophore.

FEBS Lett 364: 264-267

Kater S.B. und Mills L.R. (1991)

Regulation of growth cone behavior by calcium.

Neuroscience 11: 891-899

Kenney A.M. und Kocsis J.D. (1998)

Peripheral axotomy induces long-term c-Jun amino-terminal kinase-1 activation and activator protein-1 binding activity by c-Jun and JunD in adult rat dorsal root ganglia in vivo.

J Neurosci 18: 1318-1328

Kermer P. und Bähr M. (2002)

Prävention neuronaler Apoptose: Implikationen für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen.

Neuroforum 2.02: 193-199

Kerr J.F., Wyllie A.H. und Currie A.R. (1972)

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Br J Cancer 26: 239-257

- Khouri R., Chiu D.T., Feinberg J., Tark K.C., Harper A. und Spielholz N. (1989)**
Effects of neurite-promoting factors on the rat sciatic nerve regeneration.
Microsurgery 10: 206-209
- Kimura B., Summers C. und Phillips M.I. (1992)**
Changes in skin angiotensin II receptors in rats during wound healing.
Biochem Biophys Res Commun 187: 1083-1090
- Klocker N., Cellerino A. und Bähr M. (1998)**
Free radical scavaging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effects of brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells in vivo.
J Neurosci 18: 1038-1046
- Kuffler D.P. und Megwinoff O. (1994)**
Neurotrophic influence of denervated sciatic nerve on adult dorsal root ganglion neurons.
J Neurobiol 25: 1267-1282
- Kuo T.C., Endo K., Dharmarajan A.M., Miyazaki H., Atlas S.J. und Wallach E.E. (1991)**
Direct effect of angiotensin II on in vitro perfused rabbit ovary.
J Reprod Fertil 92: 469-474
- Laflamme L., de Gasparo M., Gallo J.M., Payet M.D. und Gallo-Payet N. (1996)**
Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT₂ receptors in NG108-15 cells.
J Biol Chem 271: 22729-22735
- Lasek R.J., Garner J.A. und Brady S.T. (1984)**
Axonal transport of cytoplasmic matrix.
J Cell Biol 99: 212-221
- Lattion A.L., Sourbrier F., Allegrini J., Hubert C., Corvol P. und Alhenc-Gelas F. (1989)**
The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme.
FEBS Lett 252 (1-3): 99-104
- Leah J.D., Herdegen T. und Bravo R. (1991)**
Selective expression of Jun proteins following axotomy and axonal transport block in peripheral nerves in the rat: evidence of a role in the regeneration process.
Brain Res 566: 198-207
- Leah J.D., Herdegen T. Murashov A., Dragunow M. und Bravo R. (1993)**
Expression of immediate early gene proteins following axotomy and inhibition of axonal transport in the rat central nervous system.
Neurosci 57: 53-66
- Leckie B.J. und Mc Ghee N.K. (1980)**
Reversible activation-inactivation of renin in human plasma.
Nature 288: 702-704

Lee V., Trojanowski J.Q. und Schlaepfer W.W. (1982)

Induction of neurofilament triplet proteins in PC12 cells by nerve growth factor.
Brain Res 238: 169-180

Lee Y.A., Liang C.S., Lee M.A. und Lindpaintner K. (1996)

Local stress, not systemic factors, regulate gene expression of the cardiac renin-angiotensin system in vivo: a comprehensive study of all its components in the dog.
Proc Natl Acad Sci USA 93: 11035-11040

Lehtonen J.Y., Horiuchi M., Daviet L., Akishita M. und Dzau V.J. (1999a)

Activation of the de-novo biosynthesis of sphingolipids mediates angiotensin II type 2 receptor-induced apoptosis.
J Biol Chem 274: 16901-16906

Lehtonen J.Y., Horiuchi M., Daviet L., Akishita M. und Dzau V.J. (1999b)

Analysis of functional domains of angiotensin II type 2 receptor involved in apoptosis.
Mol Endocrinol 13: 1051-1060

Le Noble F.A., Schreurs N.H., van Straaten H.W., Slaaf D.W., Smits J.f., Rogg H. und Struijker-Boudier H.A. (1993)

Evidence for a novel angiotensin receptor involved in angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane.
Am J Physiol 264: R460-R465

Leri A., Claudio P.P., Li Q., Wang X.W., Reiss K., Wang S.G., Malhotra A., Kajstura J. und Anversa P. (1998)

Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell.
J Clin Invest 101: 1326-1342

Leri A., Liu Y., Li B.S., Fiordaliso F., Malhotra A., Latini R., Kajstura J. und Anversa P. (2000)

Up-regulation of AT₁ and AT₂ receptors in postinfarcted hypertrophied myocytes and stretch-mediated apoptotic cell death.
Am J Pathol 156: 1663-1672

Lewin G.R. und Barde Y.A. (1996)

Physiology of the neurotrophins.
Annu Rev Neurosci 19: 289-317

Li D.Y., Yang B.C. und Mehta J.L. (1998)

Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelium cells: Role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas.
Am J Physiol 275: H568-H576

Li W., Ye Y.H., Fu B., Wang J.Z., Yu L.F., Ichiki T., Ichikawa I. und Chen X.M. (1998)

Genetic deletion of AT₂ receptor antagonizes angiotensin II-induced apoptosis in fibroblasts of the mouse embryo.
Biochim Biophys Res Commun 250: 72-76

Liebermann A.R. (1971)

The axon reaction: A review of the principal features of perikaryal responses to axonal injury.
Int Rev Neurobiol 14: 49-124

Lindenbaum M.H., Carbonetto S., Grosveld F., Flavell D. und Mushynski W.E. (1988)

Transcriptional and post-transcriptional effects of nerve growth factor on expression of the three neurofilament subunits in PC12 cells.
J Biol Chem 263: 5662-5667

Lindholm D., Heumann R., Meyer M. und Thoenen H. (1987)

Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve.
Nature 330: 658-659

Lindsay R.M. (1988)

Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons.
J Neurosci 8: 2394-2405

Lopez J.J., Lorell B.H., Ingelfinger J.R., Weinberg E.O., Schunkert H., Diamant D. und Tang S.S. (1994)

Distribution and function of cardiac angiotensin AT₁- and AT₂ receptor subtypes in hypertrophied rat hearts.
Am J Physiol 36: H844-H852

Lu D., Yang H. und Raizada M.K. (1996)

Angiotensin II regulation of neuromodulation: Downstream signaling mechanism from activation of mitogen-activated protein kinase.
J Cell Biol 135: 1609-1617

Lucius R., Gallinat S., Rosenstiehl P., Herdegen T., Sievers J. und Unger T. (1998)

The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats.
J Exp Med 188: 661-670

Lucius R., Gallinat S., Busche S., Rosenstiel P. und Unger T. (1999)

Beyond blood pressure: new roles for angiotensin II.
Cell Mol Life Sci 56: 1008-1019

Martin D.A., Combadiere B., Hornung F., Jiang D., McFarland H., Siegel R., Trageser C., Wang J., Zheng L. und Lenardo M.J. (1998)

Molecular genetic studies in lymphocyte apoptosis and human autoimmunity.
Novartis Found Symp 215: 73-82; discussion 82-91

Martin M.M., Su B. und Elton T.S. (1994)

Molecular cloning of the human angiotensin II type 2 receptor cDNA.
Biochem Biophys Res Commun 205: 645-651

Martini R. (1994)

Expression and functional roles of neural cell surface molecules extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves.
J Neurocytol 23(1): 1-28

- Matrougui K., Loufrani L., Heymes P., Levy B.I. und Hendrion D. (1999)**
Activation of AT₂ receptors by endogenous angiotensin II is involved in flow-induced dilation in rat resistance arteries.
Hypertension 34: 659-665
- Mattson M.P. (2000)**
Apoptosis in neurodegenerative disorders.
Nat Rev Mol Cell Biol 1(2): 120-129
- Matus A. (1988)**
Neurofilament protein phosphorylation – where, when and why.
Trends Neurosci 11(7): 291-292
- Mayer M., Matsuoka I., Wetmore C., Olsen L. und Thoenen H. (1992)**
Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA.
J Cell Biol. 119: 45-54
- Meffert S., Stoll M., Stecklings U.M., Bottari S.P. und Unger T. (1996)**
The angiotensin II AT₂ receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells.
Mol Cell Endocrinol 122: 59- 67
- Meier R., Spreyer P., Ortmann R., Harel A. und Monard D. (1989)**
Induction of glia-derived nexin after lesion of a peripheral nerve
Nature 342: 548-550
- Meiri K.F., Willard M. und Johnson M.I. (1988)**
Distribution and phosphorylation of the growth associated protein GAP-43 in regenerating sympathetic neurons in culture.
J Neurosci 8: 2571-2581
- Menard J., Bouhnik J., Clauser E., Richoux J.P. und Corvol P. (1983)**
Biochemistry and regulation of angiotensinogen.
Clin Exp Hypertens A5 [7&8]: 1005-1019
- Mendelsohn F.A.O., Lloyd C.J., Kachel C. und Funder J.W. (1982)**
Induction of glucocorticoids of angiotensin converting enzyme production from bovine endothelial cells in culture and in rat lung in vivo.
J Clin Invest 70: 684-692
- Mesner P.W., Epting C.L., Hegarty J.L. und Green S.H. (1995)**
A timetable of events during programmed cell death induced by trophic factor withdrawal from neuronal PC12 cells.
J Neurosci 15: 7357-7366

Millan M.A., Jacobowitz D.M., Aguilera G. und Catt K.J. (1991)

Differential distribution of AT₁ and AT₂ angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development.

Proc Natl Acad Sci USA 88: 11440-11444

Miura S. und Karnik S.S. (2000)

Ligand-independent signals from angiotensin II type 2 receptor induce apoptosis.

EMBO J 19: 4026-4035

Morris J.H., Hudson A.R. und Weddell G. (1972)

A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy.

Z Zellforsch 124: 76-164

Morrissey J.J. und Klahr S. (1999)

Effect of AT₂ receptor blockade on the pathogenesis of renal fibrosis.

Am J Physiol 276: F39-F45

Mukoyama M., Nakajama M., Horiuchi M., Sasamura H., Pratt R.E. und Dzau V.J. (1993)

Expression cloning type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven transmembrane receptors.

J Biol Chem 268: 24539-24542

Muma N.A., Slunt H.H. und Hoffman P.N. (1991)

Postnatal increases in neurofilament gene expression correlate with the radial growth of axons.

J Neurocytol 20: 844-854

Munzenmaier D.H. und Greene A.S. (1996)

Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure.

Hypertension 27: 760-765

Nakajima M., Mukoyama M., Pratt R.E., Horiuchi M. und Dzau V.J. (1993)

Cloning of cDNA and analysis of the gene for the mouse angiotensin II type 2 receptor.

Biochem Biophys Res Commun 197: 393-399

Nahmias C., Cazaubon S.M., Briend-Sutren M.M., Lazard D., Villgeios P. und Strosberg A.D. (1995a)

Angiotensin II AT₂ receptors are functionally coupled to protein tyrosine dephosphorylation in N1E-115 neuroblastoma cells.

Biochem J 306: 87-92

Nahmias C. und Strosberg A.D. (1995b)

The angiotensin AT₂ receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function.

Trends Pharmacol Sci 16: 223-225

Nakajima M., Hutchinson H.G., Fujinaga M., Hayashida W., Morishita R., Zang L., Horiuchi M., Pratt R.E. und Dzau V.J. (1995)

The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer.

Proc Natl Acad Sci USA 92: 10663-10667

Nickols J.C., Valentine W., Kanwal S. und Carter B.D. (2003)

Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation.

Nat Neurosci 6: 161-167

Nio Y., Matsubara H., Murasawa S., Kanasaki M. und Inada M. (1995)

Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction.

J Clin Invest 95: 46-54

Oberhammer F., Wilson J.W., Dive C., Morris I.D., Hickman J.A., Wackeling A.E., Walker P.R. und Sikorska M. (1993)

Apoptotic cell death in epithelial cells: cleavage of DNA 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation.

EMBO J 12: 3679-3684

Obermüller N., Unger T., Culman J., Gohlke P. de Gasparo M. und Bottari S.P. (1991)

Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat brain nuclei.

Neurosci Lett 132: 11-15

Omer G.E. (1981)

Methods of assessment of injury and recovery of peripheral nerves.

Surg Clin North Am 61: 303-319

Oudega M. und Hagg T. (1996)

Nerve growth factor promotes regeneration of sensory axons into adult spinal cord.

Exp Neurol 140: 218-229

Pals D.T., Mascucci F.D., Denning G.S., Sipos F. und Fessler D.C. (1971)

Role of the pressure action of ANG II in experimental hypertension.

Circ Res 29: 673-681

Pang Q.J., Luo Y.X., Wu Y.G., Li Z.F., Fang H., Yuan T.Z., Zhang W.R. und Cheng Q.W. (1993)

Experimental studies on peripheral nerve regeneration enhanced by nerve growth factor.

J Tongi Med Univ 13: 34-39

Peart W.S. (1991)

Evolution of renin.

Hypertension 18 (Suppl 5), III: 100-108

Pierzchalski P., Reiss K., Cheng W., Cirielli C., Kajstura J., Nitaahara J.A., Rizk M., Capogrossi M.C. und Anversa P. (1997)

P53 induces myocyte apoptosis via the activation of the renin-angiotensin system.

Exp Cell Res 234: 57-65

Pollman M.J., Yamada T., Horiuchi M. und Gibbons G.H. (1996)

Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II.

Circ Res 79: 748-756

Portera-Cailliau C., Price D.L. und Martin L.J. (1997)

Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum.

J Comp Neurol 378(1): 88-104

Pratt R.E. (1996)

Regulation of vascular smooth muscle cell growth by angiotensin II.

Blood Pressure 5[Suppl.]: 6-9

Pucell A.G., Bumpus F.M. und Husain A. (1987)

Rat ovarian angiotensin II receptors.

Biol Chem 262: 1076-7080

Pucell A.G., Hodges J.C., Sen I., Bumpus F.M. und Husain A. (1991)

Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type 2-angiotensin II-receptor.

Endocrinology 128: 1947-1959

Purves D. und Voyvodic J.T. (1987)

Imaging mammalian nerve cells and their connections over time in living animals.

Trends Neurosci 10: 398-404

Raff M.C. (1992)

Social controls on cell survival and cell death.

Nature 356: 397-400

Reed J.C. (2000)

Mechanisms of apoptosis.

Am J Pathol 157(5): 1415-1430

Regitz-Zagrosek V., Auch-Schwelk W., Hess B., Klein U., Duske E., Steffen C., Hildebrandt A.G. und Fleck E. (1995)

Tissue- and subtype-specific modulation of angiotensin II receptors by chronic treatment with cyclosporine A, angiotensin-converting enzyme inhibitors and AT₁ antagonists.

J Cardiovascular Pharmacol 26: 66-72

Reinecke K., Lucius R., Reinecke A., Rickert U., Herdegen T. und Unger T. (2003)

Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of AT₂ receptor and the transcription factor NF- κ B.

FASEB J 2003 Sep 18 [Epub ahead of print].

Rich K.M., Yip H.K., Osborne P.A., Schmidt R.E. und Johnson E.M. (1984)

Effect of nervegrowth factor in adult dorsal root ganglia neurons and its response in injury.

J Comp Neurol 230: 110-118

Rich K.M., Luszczynski J.R., Osborne P.A. und Johnson E.M. (1987)

Nerve growth factor protects adult sensory neurons from cell death and atrophy caused by nerve injury.

J Neurocytol 16: 261-268

Rich K.M., Alexander T.D., Pryor J.C. und Hollowell J.P. (1989)

Nerve growth factor enhances regeneration through silicone chambers.

Exp Neurol 105: 162-170

Richardson P.M. und Riopelle R.J. (1984)

Uptake of nerve growth factor along peripheral and spinal axons of primary sensory neurons.

J Neurosci 4: 1683-1689

Richardson P.M. und Lu X. (1994)

Inflammation and axonal regeneration.

J Neurol 241: 57-60

Rogers S.L., Letourneau P.C., Palm S.L., McCarthy J. und Furcht L.T. (1983)

Neurite extension by peripheral and central nervous system neurons in response to substratum-bound fibronectin and laminin.

Dev Biol 98: 212-220

Rosenstiel P., Gallinat S., Arlt A., Unger T., Sievers J. und Lucius R. (2002)

Angiotensin AT₂ receptor ligands: do they have potential as future treatments for neurological disease?

CNS Drugs 16(3):145-53

Roy S.N., Kusari J., Soffer R.L., Lai C.Y. und Sen G.C. (1988)

Isolation of cDNA clones of rabbit angiotensin converting enzyme: identification of two distinct mRNAs for the pulmonary and the testicular isozymes.

Biochem Biophys Res Commun 155 (2): 678-684

Ruiz-Ortega M., Lorenzo O., Ruperez M., Konig S., Wittig B. und Egidio J. (2000)

Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms.

Circ Res 86: 1266-1272

Ryan K.M., Ernst M.K., Rice N.R. und Vousden K.H. (2000)

Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death.

Nature 404: 892-897

Sakaguchi T., Okada M., Kitamura T. und Kawasaki K. (1993)

Reduced diameter and conduction velocity of myelinated fibers in the sciatic nerve of a neurofilament-deficient mutant quail.

Neurosci Lett 153: 65-68

Sandberg K., Hong J., Millan M.A. und Catt K.J. (1992)

Amphibian myocardial angiotensin II receptors are distinct from mammalian AT₁ und AT₂ receptor subtypes.

FEBS Lett 284: 281-284

Santos P.M., Winterowd J.G., Allen G.G., Bothwell M.A. und Rubel E.W. (1991)

Nerve growth factor: increased angiogenesis without improved nerve regeneration.
Otolaryngol Head Neck Surg 105: 12-25

Santos X., Rodrigo J., Hontanilla B. und Bilbao G. (1998)

Evaluation of peripheral nerve regeneration by nerve growth factor locally administered with a novel system.
J Neurosci Meth 85: 119-127

Sasamura H., Hein L., Krieger J.E. und Dzau V.J. (1992)

Cloning, characterization and expression of two angiotensin receptor (AT₁) isoforms from the mouse genome.
Biochem Biophys Res Commun 185: 253-259

Saveedra J.M. (1992)

Brain und pituitary angiotensin.
Endocr Rev 13: 329-380

Schaden H., Stuermer C.A. und Bähr M. (1994)

GAP-43 immunoreactivity and axon regeneration in retinal ganglion cells of the rat.
J Neurobiol 25: 1570-1578

Schelling P., Fischer H. und Ganten D. (1991)

Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy?
Am J Physiol 33: R917-R923

Schieffer B., Wirger A., Meybrunn M., Seitz S., Holtz J., Riede U.N. und Drexler H. (1994)

Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat.
Circulation 89(5): 2273-2282.

Schmieder R.E., Erdmann J., Delles C., Jacobi J., Fleck E., Hilgers K. und Regitz-Zagrosek V. (2001)

Effect of the angiotensin II type 2-receptor gene (+1675 G/A) on left ventricular structure in humans.
J Am Coll Cardiol 37(1): 175-82

Schütze S., Potthoff K., Machleidt T., Berkovic D., Wiegmann K. und Krönke M. (1992)

TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced 'acid' sphingomyelin breakdown.
Cell 71: 765-776

Schwartz M.L., Shneidman P.S., Bruce J. und Schlaepfer W.W. (1992)

Actinomycin prevents the destabilization of neurofilament mRNA in primary sensory neurons.
J Biol Chem 267: 24596-24600

Seckel B.R. (1990)

Enhancement of peripheral nerve regeneration.
Muscle Nerve 13: 785-800

Sendtner M., Stöckli K.A. und Thoenen H. (1992)

Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration.

J Cell Biol 118: 139-148

Shankland S.J. und Wolf G. (2000)

Cell cycle regulatory proteins in renal disease: Role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis.

Am J Physiol Renal Physiol 278(4): F515-529

Shenoy U.V., Richards E.M., Huang X.C. und Sumners C. (1999)

Angiotensin II type 2 receptor-mediated apoptosis of cultured neurons from newborn rat brain.

Endocrinology 140: 500-509

Siegl P.K.S. (1993)

Discovery of losartan, the first specific non-peptide ANG II receptor antagonist.

J Hypertension 11 (Suppl 3): S19-S22

Simon M.R., Kamlay M.T., Desai S.G. und Majumdar A.P. (1991)

Angiotensin II augmentation of tyrosine kinase activity in human adherent mononuclear cells.

Biochem Med Metab Biol 45(1): 48-55

Skeggs L.T., Kahn J.R. und Shumway N.P. (1956)

The preparation and function of the hypertensive converting enzyme.

J Exp Med 103: 295-299

Skene J.H., Jacobson R.D., Snipes G.J., McGuire C.B., Norden J.J. und Freeman J.A. (1986)

A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes.

Science 233: 783-786

Snow D.M., Lemmon V., Carrino D., Caplan A. und Silver J. (1990)

Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro.

Exp Neurol 109: 111-130

Stanislas-Leguern G., Mordeler Dambrine M., Dusser D., Huesca M., Chretien J. und Huchon G.J. (1986)

In vitro synthesis of angiotensin converting enzyme by alveolar macrophages is increased in disseminated sarcoidosis.

Lung 164: 269-277

Steckelings U., Obermüller N., Bottari S.P., Quadri F., Veltmar A. und Unger T. (1992)

Brain angiotensin: receptors, actions and possible role in hypertension.

Pharmacol Toxicol 70 [Suppl II]: 23-27

Stoll M., Steckelings U.M., Paul M., Bottari S.P., Quadri F., Veltmar A. und Unger T. (1995a)

The angiotensin AT₂ receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells.

J Clin Invest 95: 651-657

Stoll M., Meffert S., Stroth U. und Unger T. (1995b)

Growth and antigrowth: angiotensin and the endothelium.

Neuroreport 3: 703-704

Stoll M., Hahn A.W., Jonas U., Zhao Y., Schieffer B., Fischer J.W. und Unger T. (2002)

Identification of a zinc finger homoeodomain enhancer protein after AT₂ receptor stimulation by differential mRNA display.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 22(2): 231-237

Stroth U., Meffert S., Gallinat S. und Unger T. (1997)

Angiotensin II induced differentiation via AT₂ receptors differs from NGF-dependent mechanisms.

J Hypertension 15: S64

Stroth U., Meffert S., Gallinat S. und Unger T. (1998)

Angiotensin II and NGF differentially influence microtubule proteins in PC12W cells: role of the AT₂ receptor.

Mol Brain Res 53: 187-197

Stroth U., Blume A., Mielke K. und Unger T. (2000)

Angiotensin AT₂ receptor stimulates ERK1 and ERK2 in quiescent but inhibits ERK in NGF-stimulated PC12W cells.

Brain Res Mol Brain Res 78: 175-180

Suidan H., Stone S., Hemmings B.A. und Monard D. (1992)

Thrombin causes neurite retraction in neuronal cells through activation of cell surface receptor.

Neuron 8: 363-375

Sumner C., Tang W., Zelezna B. und Raizada M. (1991)

Angiotensin II receptor subtypes are coupled to distinct signal transduction mechanisms in neurons and astrocytes from rat brain.

Proc Natl Acad Sci USA 88: 7567-7571

Sunderland S. (1990)

The anatomy and physiology of nerve injury.

Muscle Nerve 13: 117-121

Svensson M. and Aldskogius H. (1992)

The effect of axon injury on microtubule-associated proteins MAP2,3 and 5 in the hypoglossal nucleus in the adult rat.

J Cytol 21: 222-231

Takahasi K., Barnhan S., Kambayashi Y., Shirai H. und Inagami T. (1994)

Protein phosphatase inhibition by angiotensin II in rat pheochromocytoma cells through type 2 receptor, AT₂.

Biochem Biophys Res Commun 207: 593-598

Tanaka M., Ohnishi J., Ozawa Y., Sugimoto M., Usuki S. und Naruse M. (1995)

Characterization of angiotensin II receptor type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells.

Biochem Biophys Res Commun 207: 593-598

Taniuchi M., Clark H.B. und Johnson E.M. (1986)

Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy.

Proc Natl Acad Sci USA 83: 4094-4098

Tapscott S.J., Bennett G.S. und Holtzer H. (1981)

Neuronal precursor cells in the chick neural tube express neurofilament proteins.

Nature 292: 836-838

Tetzlaff M., Gillad V.H., Leonard C., Bisby M.A. und Gilad G.M. (1988)

Retrograde changes in transglutaminase activity after peripheral nerve injuries.

Brain Res 445: 142-146

Thoenen H., Bandtlow C., Heumann R., Lindholm D., Meyer M. und Rohrer H. (1988)

Nerve growth factor: Cellular localization and regulation of synthesis.

Cell Mol Neurobiol 8(1): 35-40

Tigerstedt R. und Bergmann P. (1898)

Niere und Kreislauf.

Scand Arch Physiol 223-271

Timmermans P.B., Wong P.C., Chiu A.T., Herblin W.F., Benfield P., Carini D.J., Lee R.J., Wexler R.R., Saye J.A. und Smith R.D. (1993)

Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists.

Pharmacol Rev 45: 205-251

Tipnis S.R., Hooper N.M., Hyde R., Karran E., Christie G. und Turner A.J. (2000)

A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as an captopril insensitive carboxypeptidase.

J Biol Chem 275: 33238-33243

Tomei L.D., Shapiro J. und Cope F.O. (1993)

Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells: evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double-strand cleavage.

Proc Natl Acad Sci USA 90: 853-857

Tona A., Perides G., Rahemtulla F. und Dahl D. (1993)

Extracellular matrix in regenerating rat sciatic nerve: a comparative study on the localization of laminin, hyaluronic acid, and chondroitin sulfate proteoglycans, including versican.

J Histochem Cytochem 41(4): 593-599

Tonge D.A. und Golding J.P. (1993)

Regeneration and repair of the peripheral nervous system.
Neurosci 5: 385-390

Tsutsumi K., Strömberg C., Viswanathan M. und Saveedra J.M. (1991a)

Angiotensin II receptor subtypes in fetal tissue of the rat: autoradiography, guanine nucleotide sensitivity and association with phosphoinoside hydrolysis.
Endocrinology 129: 1075-1082

Tsutsumi K. und Saveedra J.M (1991b)

Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes AT₁ und AT₂; in rat brain.
Am J Physiol 261: R209-R216

Tsutsumi K. und Saveedra J.M. (1992)

Heterogeneity of angiotensin II AT₂ receptors in the brain.
Mol Pharmacol 41: 290-297

Tsuzuki S., Ichiki T., Nakabuko H., Kitami Y., Guo D.F., Shirai H. und Inagami T. (1994)

Molecular cloning and expression of the gene encoding human angiotensin II type 2 receptor.
Biochem Biophys Res Commun 200: 1449-1454

Tsuzuki S., Eguchi S. und Inagami T. (1996)

Inhibition of cell proliferation and activation of protein tyrosine phosphatase mediated by angiotensin II type 2 (AT₂) receptor in R3T3 cells.
Biochem Biophys Res Commun 228: 825-830

Umansky S.R. (1996)

Apoptosis: molecular and cellular mechanisms.
Molecular Biol 613: 212-220

Unger T., Schüll B. und Hübner D. (1981)

Plasma converting enzyme activity does not reflect effectiveness of oral treatment with captopril.
Eur J Pharmacol 72: 255-259

Unger T., Badoer E., Ganten D., Hermann K. und Lang R.E. (1988)

Brain angiotensin: pathways and pharmacology.
Circulation 77: 40-54

Unger T., Gohlke P., Paul M. und Rettig R. (1991)

Tissue renin-angiotensin system: fact or fiction?
J Cardiovasc Pharmacol (Suppl 2): 20-25

Unger T., Chung O., Csikos T., Culman J., Gallinat S., Gohlke P., Höhle S., Meffert S., Stoll M., Stroth U., und Zhu Y.Z. (1996)

Angiotensin receptors.
J Hypertension 14: S95-S103

Unger T. (1999)

The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme.
J Hypertens 17: 1775-1786

Urata H., Healy B., Stewart R.W., Bumpus F.M. und Husain A. (1990)

Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts.
Circ Res 66 (4): 883-890

Vale R.D. (1987)

Intracellular transport using microtubule-based motors.
Annu Rev Cell Biol 3: 347-378

van der Zee C.E., Nielander H.B., Vos J.P., Lopes da Silva S., Verhaagen J., Östreicher A.B., Schrama L.H., Schotman P. und Gispen W.H. (1989)

Expression of growth-associated protein B-50 (GAP 43) in dorsal root ganglia and sciatic nerve during regenerative sprouting.
J Neurosci 9(10): 3505-3512

van Kats J.P., Duncker D.J., Haitsma D.B., Schuijt M.P., Niebuur R., Stubenitsky R., Boomsma F., Schalekamp M.A., Verdouw P.D. und Danser A.H. (2000)

Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade prevent cardiac remodeling in pigs after myocardial infarction: role of tissue angiotensin II.
Circulation 102(13):1556-1563

Vaudano E., Rosenblad C. und Bjorklund A. (2001)

Injury induced c-Jun expression and phosphorylation in the dopaminergic nigral neurons of the rat: correlation with neuronal death and modulation by glial-cell-line-derived neurotrophic factor.
Eur J Neurosci 13: 1-14

Vaughan P.J., Su J., Cotman C.W. und Cunningham D.D. (1994)

Protease nexin-1, a potent thrombin inhibitor, is reduced around cerebral blood vessels in Alzheimer's disease.
Brain Res 668: 160-170

Verhaagen J., Östreicher A.B., Edwards P.M., Veldman H., Jennekens F.G.I. und Gispen W.H. (1988)

Light and electronmicroscopical study of phosphoprotein B-50 following denervation and reinnervation of rat soleus muscle.
J Neurosci 8: 1759-1766

Viswanathan M., Tsutsumi K., Correa F.M.A. und Saveedra J.M. (1991)

Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development.
Biochem Biophys Res Commun 179: 1361-1367

Viswanathan M. und Saveedra J.M. (1992)

Expression of angiotensin II AT₂ receptors in the rat skin during experimental wound healing.
Peptides 13: 783-786

Walker J.L., Resig P., Guarnieri S., Siskin B.F. und Evans J.M. (1994)

Improved footprint analysis using video recording to assess functional recovery following injury to the rat sciatic nerve.

Restor Neurol Neurosci 6: 189-193

Walker P.R., Smith C., Youdale T., Leblanc J., Whitfield J.F. und Sikorska M. (1991)

Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes.

Cancer Res 51: 1078-1085

Walker P.R. und Sikorska M. (1997)

New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis.

Biochem Cell Biol 75: 287-299

Walther T., Olah L., Harms C., Maul B., Bader M., Hortnagl H., Schultheiss H.P. und Mies G. (2002)

Ischemic injury in experimental stroke depends on angiotensin II.

FASEB J 16(2): 169-176

Wang M.S., Zeleny-Pooley M. und Gold B.G. (1997)

Comparative dose-dependence study of FK 506 and Cyclosporin A on the rate of axonal regeneration in the rat sciatic nerve.

J Pharmacol Exp Therapeutics 282(2): 1084-1093

Wietholter H., Eckert S. und Stevens A. (1990)

Measurement of atactic and paretic gait in neuropathies of rats based on analysis of walking tracks.

J Neurosci Methods 32(3): 199-205

Wilson S.K., Lynch D.R. und Snyder S.H. (1987)

Angiotensin converting enzyme labeled with [3H] captopril. Tissue localizations and changes in different models of hypertension in the rat.

J Clin Invest 80: 841-851

Wolf G., Haberstroh U. und Neilson E.G. (1992)

Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells.

Am J Pathol 140 (1): 95-107

Wolf G., Ziyadeh F.N., Tomaszewski J., Caron R.J., Wenzel U., Zahner G., Helmchen U. und Stahl R.A. (1997)

Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. Role of the angiotensin type 2 receptor.

J Clin Invest 100: 1047-1058

Wong J. und Oblinger M.M. (1990)

Changes in neurofilament gene expression occur after axotomy of dorsal root ganglion neurons: an in situ hybridization study.

Met Brain Dis 2: 291-303

Woodhams P.L., Calvert R. und Dunnet S.B. (1989)

Monoclonal antibody G10 against microtubule-associated protein 1x distinguished between growing and regenerating axons.
Neurosci 28: 49-59

Yamada T., Horiuchi M. und Dzau V.J. (1996)

Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death.
Proc Natl Acad Sci USA 93: 156-160

Yang C.R., Phillips M.I. und Renaud L.P. (1992)

Angiotensin II receptor activation depolarizes rat supraoptic neurons in vitro.
Am J Physiol Reg Integ Comp Physiol 321: R1333-R1338

Yang H., Lu D., Yu K. und Raizada M.K. (1996)

Regulation of the neuromodulatory actions of angiotensin II in brain neurons by the RAS-dependent mitogen-activated protein kinase pathway.
J Neurosci 16: 4047-4058

Yawo H. (1987)

Changes in the dendritic geometry of mouse superior cervical ganglion cells following postganglionic axotomy.
J Neurosci 7(11): 3703-3711

Yoshimura Y., Karube M., Aoki H., Oda T., Koyama N., Nagai A., Akimoto Y., Hirano H. und Nakamura Y. (1996)

Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT₂ receptor subtype.
Endocrinology 137: 1204-1211

Zhang J. und Pratt R.E. (1996)

The AT₂-receptor selectively associates with G_{i2} and G_{i3} in the rat fetus.
J Biol Chem 271: 15026-15033

Zhao Y., Biermann T., Luther C., Unger T., Culman J. und Gohlke P. (2003)

Contribution of bradykinin and nitric oxide to AT₂ receptor mediated differentiation in PC12 W cells.
J Neurochem 85(3): 759-767

Zhu M., Neubig R.R., Wade S.M., Posner P., Gelband C.H. und Summers C. (1997)

Modulation of K⁺ and Ca²⁺ currents in cultured neurons by an angiotensin II type 1a receptor peptide.
Am J Physiol 273: C1040-C1048

Zhu M., Posner P., Gelband C.H. und Summers C. (1998)

Angiotensin II type 1 receptor-mediated inhibition of voltage-dependent K⁺ current in cultured neurons: Role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II.
FASEB J 12: A54

Zhu Y.Z., Chimon G.N., Zhu Y.C., Lu Q., Li B., Hu H.Z., Yap E.H., Lee H.S. und Wong P.T. (2000a)

Expression of angiotensin II AT₂ receptor in the acute phase of stroke in rats.
Neuroreport 11: 1191-1194

Zhu Y.Z., Zhu Y.C., Li J., Schafer H., Schmidt W., Yao T. und Unger T. (2000b)

Effects of losartan on haemodynamic parameters and angiotensin receptor mRNA levels in the rat heart after myocardial infarction.
J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 1(3): 257-262

Zohn I.E., Yu H., Li X., Cox A.D. und Earp H.S. (1995)

Angiotensin II stimulates calcium-dependent activation of c-Jun N-terminale kinase.
Mol Cell Biol 15: 6160-6168

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Durchführung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Professor Thomas Unger für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung dieser Arbeit und dass er mir die Möglichkeit einräumte, sehr früh mit dieser Arbeit zu beginnen.

Herrn Professor Thomas Herdegen danke ich für die Einarbeitung in die operative Methodik und die anfängliche Betreuung.

Für die Realisierung der einzelnen Projekte und die Bereitstellung technischer Hilfsmittel möchte ich mich stellvertretend für die Mitarbeiter des Instituts für Anatomie Herrn Prof. Dr. Ralph Lucius danken. Darüber hinaus gilt ihm mein besonderer Dank für seine immer währende persönliche Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern für ihre Liebe und Unterstützung jeglicher Art.

Meinem Mann für so vieles sowie meinen Kindern, die mir tagsüber Freude und abends etwas Zeit zum Schreiben gaben.

8. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Kirstin Reinecke, geb. Stöter
Wohnort	Lornsenstraße 1 24105 Kiel
Geburtsdatum	28. Juni 1972
Geburtsort	Göttingen
Eltern	Dr. Jochen Stöter Gertraud Stöter, geb. Hesshaus
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet mit Dr. Alexander Reinecke
Kinder	Frederek, 1. Oktober 2000 Ferdinand, 25. August 2002

Schulbildung

1978 - 1982	Grundschule Stockhausenstr., Neustadt
1982 - 1984	Orientierungsstufe Süd, Neustadt
1984 - 1991	Gymnasium Neustadt Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

PTA-Ausbildung

1991 - 1993	Sabine Blindow Schule, Hannover
1993 – 1994	PTA-Praktikum in der Post-Apotheke, Neustadt

Studium

1994	Studiengang Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
1996	1. Staatsexamen
1998	2. Staatsexamen
1998	1. Teil PJ am Institut für Pharmakologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
1999	2. Teil PJ in der Mohren-Apotheke, Kiel
1999	3. Staatsexamen

Berufstätigkeit

seit 1999	Offizintätigkeit in der Mohren-Apotheke, Kiel
-----------	---

Promotion

seit 1998	Am Institut für Pharmakologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Labor Prof. Dr. Thomas Unger
-----------	---

8. Kongreßbeiträge und Publikationen

Vorträge

Reinecke K, Lucius R, Herdegen T, Unger T

AngiotensinII beschleunigt die funktionelle Regeneration im Ischiasnerv der Ratte
Hypertonie 2000, Heidelberg, 2000

Reinecke K, Lucius R, Herdegen T, Unger T

Angiotensin II accelerates functional regeneration in the rat sciatic nerve
5th Annual Meeting of the European Council for Blood Pressure and Cardiovascular
Research (ECCR), Nordwijkerhout, The Netherlands, 2001

Originalarbeiten

Reinecke K, Lucius R, Reinecke A, Rickert U, Herdegen T, Unger T

*Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of
AT₂ receptor and the transcriptional factor NF- κ B.*
FASEB J 2003; 17(14): 2094-2096