

Untersuchungen zum Einfluss von Angiotensin II auf Schwann-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

Uta Rickert

Kiel, Mai 2008

Referent:

Prof. Dr. R. Lucius

Korreferent/in:

Prof. Dr. M. Dittmar

Tag der mündlichen Prüfung:

14. 07. 2008

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Das periphere Nervensystem.....	1
1.2 Schwann-Zellen.....	2
1.2.1 Entwicklung der Schwann-Zellen.....	2
1.2.2 Die physiologische Funktion von Schwann-Zellen.....	4
1.2.3 Schwann-Zellen als immunkompetente Zellen.....	7
1.3 Waller-Degeneration.....	8
1.3.1 Schwann-Zellen als Immunmodulatoren der Waller-Degeneration und ihr Einfluss auf neuroregenerative Prozesse.....	9
1.4 Das Renin-Angiotensin-System.....	12
1.4.1 Das Peptidhormon Ang II.....	14
1.4.2 Ang II und seine Rezeptoren.....	15
1.5 Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Chemikalien.....	20
2.2 Kultivierung permanenter Zelllinien.....	20
2.3 Isolierung und Kultur primärer Zellen	21
2.3.1 Isolierung und Kultur von Schwann-Zellen aus den <i>Nn. ischiadici</i>	22
2.3.2 Isolierung und Kultur von Schwann-Zellen aus Spinalganglien.....	24
2.3.3 Isolierung und Kultur von Fibroblasten aus Spinalganglien.....	26
2.4 Misch- und Co-Kultivierung von Zellen.....	27
2.5 Fotografieren von Zellkulturen.....	27
2.6 Phänotypisierung der primären Zellkulturen.....	27
2.6.1 Phänotypisierung mittels Immunzytochemie.....	27
2.6.1.1 Immunzytochemische Färbung von Zellproteinen.....	28
2.6.1.1.1 Enzym-Substrat-spezifische Detektion der ge- bundenen Primäantikörper.....	28
2.6.1.1.2 Detektion der gebundenen Primäantikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	29
2.6.2 Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie.....	30
2.7 Untersuchungen zu den Ang II-Rezeptoren.....	31
2.8 Stimulation von Zellen.....	32
2.9 Isolierung von RNA aus Monolayer-Kulturen.....	32
2.10 Reverse Transkription.....	33

	Seite
2.11 Semiquantitative RT-PCR.....	34
2.11.1 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	36
2.12 Realtime-RT-PCR.....	37
2.12.1 Realtime-RT-PCR mit dem TaqMan®-System.....	38
2.12.2 Realtime-RT-PCR mit dem Sybr®Green-System.....	39
2.13 Isolierung von Zell-Proteinen.....	41
2.13.1 Isolierung von Kernproteinen.....	41
2.13.2 Isolierung von Gesamtproteinen für Western-Blot-Analysen.....	42
2.14 Western-Blot.....	43
2.14.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) für Western Blot.....	43
2.14.2 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran.....	44
2.14.3 Immunfärbung.....	45
2.15 Untersuchungen zur Lokalisation von NF-κB.....	45
2.15.1 EMSA.....	46
2.15.1.1 Radioaktive Markierung einer NF-κB-Oligonukleotid- Sonde.....	47
2.15.1.2 Herstellung des Gels für die PAGE.....	48
2.15.1.3 DNA-Gel-Shift.....	48
2.15.1.4 Darstellung der Gelshiftbanden.....	49
2.16 Proliferationsbestimmung durch ³ H-Thymidin-Inkorporation.....	49
2.17 Untersuchungen zum Nervenwachstumsfaktor NGF.....	50
2.17.1 NGF-Sandwich-ELISA.....	51
2.18 Untersuchungen zur induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und zur Freisetzung von NO.....	51
2.18.1 Messung von NO im Zellkulturüberstand.....	52
2.19 Untersuchungen zur Apoptose-Induktion durch Ang II.....	53
2.19.1 DNA-Laddering.....	53
2.20 Histologische Untersuchungen.....	55
2.20.1 Anfertigung von Gefrierschnitten.....	55
2.20.2 Immunhistochemie.....	55
2.20.2.1 Enzym-Substrat-spezifische Detektion.....	56
2.21 Myelinscheidenfärbung an Semidünnschnitten.....	56
2.22 Statistische Auswertung.....	56
3. Ergebnisse.....	57
3.1 Isolierung, Kultivierung und Phänotypisierung primärer Schwann-Zellen.....	57
3.1.1 Phänotypisierung der primären Schwann-Zell-Kulturen.....	58
3.1.1.1 Die selektive Markierung von Schwann-Zellen über die Detektion ihrer p75 ^{LNGF} -Rezeptoren.....	59
3.1.1.2 Immunzytochemische Phänotypisierung der Schwann- Zell-Kulturen.....	63

	Seite
3.1.1.3 Durchflusszytometrische Phänotypisierung der Schwann-Zell-Kulturen.....	64
3.2 Ang II–Rezeptoren auf Schwann-Zellen.....	67
3.2.1 Nachweis der Expression von AT _{1a} - und AT ₂ -Rezeptor-mRNA in Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen sowie in Spinalganglien-Fibroblasten mittels RT-PCR.....	67
3.2.2 Nachweis der AT ₁ - und AT ₂ -Rezeptoren auf Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen.....	68
3.2.2.1 AT ₁ - und AT ₂ -Rezeptoren auf Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen.....	68
3.3 Einfluss von Ang II auf Schwannoma-Zellen und primäre Schwann-Zellen.....	70
3.3.1 Einfluss von Ang II auf die AT _{1a} - und AT ₂ -Rezeptor-mRNA.....	70
3.3.1.1 Ang II regulierte die Expression der AT _{1a} - und AT ₂ -Rezeptor-mRNA in primären Schwann-Zellen herab..	71
3.3.1.2 Ang II hatte in Spinalganglien-Fibroblasten keinen Einfluss auf die Expression der AT _{1a} - und AT ₂ -Rezeptor-mRNA.....	72
3.3.1.3 Ang II regulierte in Schwannoma-Zellen aus Co-Kulturen die Expression der AT ₂ -Rezeptor-mRNA leicht herab.....	73
3.3.2 Einfluss von Ang II auf die Synthese der AT ₁ - und AT ₂ -Rezeptor-Proteine in primären Schwann-Zellen.....	74
3.3.2.1 Ang II regulierte die Synthese der AT ₁ -Rezeptor-Proteine herauf und die Synthese der AT ₂ -Rezeptor-Proteine herab.....	74
3.4 Ang II-Rezeptor-vermittelter Einfluss von Ang II auf Schwannoma-Zellen und primäre Schwann-Zellen.....	75
3.4.1 Ang II förderte die Translokation von NF-κB in den Zellkern.....	75
3.4.2 Einflussnahme von Ang II auf die Zellproliferation.....	77
3.4.2.1 Ang II wirkte proliferationsfördernd auf primäre Schwann-Zellen.....	78
3.4.2.2 Ang II hatte keinen Einfluss auf die Proliferation oxidativ gestresster als auch oxidativ ungestressten Spinalganglien-Fibroblasten.....	79
3.4.2.3 Ang II wirkte proliferationsfördernd auf Schwannoma-Zellen in Co-Kulturen.....	79
3.4.3 Einfluss von Ang II auf die Proliferation von Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen in Gegenwart von AT ₁ - und AT ₂ -Rezeptorantagonisten.....	81

	Seite
3.4.3.1	Die proliferationssteigernde Wirkung von Ang II in Schwannoma-Zellen konnte keinem Ang II-Rezeptortypen zugeordnet werden..... 81
3.4.3.2	In primären Schwann-Zellen reduzierte eine Blockade des AT ₁ -Rezeptors die proliferationssteigernde Wirkung von Ang II, während eine Blockade des AT ₂ -Rezeptors diese noch weiter erhöhte..... 82
3.4.4	Auswirkung einer Ang II-Stimulation von Schwannoma-Zellen auf deren NGF-Expression und Freisetzung von NGF..... 84
3.4.4.1	Sowohl Ang II als auch oxidativer Stress induzierten tendenziell eine erhöhte NGF-mRNA-Expression in Schwannoma-Zellen..... 84
3.4.4.2	Ang II stimulierte Schwannoma-Zellen zur erhöhten NGF-Freisetzung..... 85
3.4.5	Einfluss von Ang II auf die NO-Produktion und die mRNA-Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen..... 86
3.4.5.1	Ang II hatte keinen Einfluss auf die NO-Freisetzung von Schwannoma-Zellen..... 88
3.4.5.2	Ang II übte auch auf die iNOS-mRNA-Expression in primären Schwann-Zellen keinen Einfluss aus..... 89
3.4.6	Ang II induzierte keine Apoptose in Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen..... 91
3.5	Einfluss von Ang II auf die axonale Regeneration <i>in vivo</i> 92
3.5.1	Ang II übte <i>in vivo</i> eine positive Wirkung auf die GAP-43-Expression in verletzten Nervenfasern aus und förderte die axonale Regeneration..... 93
3.5.2	Ang II beschleunigte <i>in vivo</i> die Remyelinisierung verletzter Nervenfasern..... 94
4.	Diskussion 97
4.1	Primäre Schwann-Zell-Kulturen..... 98
4.2	AT ₁ - und AT ₂ -Rezeptoren..... 99
4.2.1	Nachweis von Ang II-Rezeptoren..... 100
4.3	Stimulation von Schwann-Zellen mit Ang II..... 101
4.4	Einfluss von Ang II auf die Ang II-Rezeptorexpression in Schwann-Zellen..... 102
4.5	AT ₁ - und AT ₂ -Rezeptor-vermittelte Effekte von Ang II..... 104
4.5.1	Einfluss von Ang II auf den Transkriptionsfaktor NF-κB..... 104
4.5.2	Beeinflussung der Zellproliferation in Schwannoma-Zellen, primären Schwann-Zellen und Spinalganglien-Fibroblasten durch Ang II..... 107

	Seite
4.5.3 Einfluss von oxidativem Stress auf Ang II-stimulierte primäre Schwann-Zellen und Fibroblasten.....	108
4.5.4 Einfluss von Ang II auf die Expression der NGF-mRNA und auf die Freisetzung von NGF.....	110
4.5.5 Einfluss von Ang II auf die Freisetzung von NO.....	112
4.5.6 Einfluss von Ang II auf die Induktion von Apoptose.....	112
4.6 Einfluss von Ang II auf die funktionelle Regeneration peripherer Nerven <i>in vivo</i>	113
4.6.1 Ang II induzierte <i>in vivo</i> eine erhöhte GAP-43-Expression im distalen Nervensegment.....	113
4.6.2 Ang II induzierte <i>in vivo</i> eine beschleunigte Remyelinisierung.....	114
5. Zusammenfassung.....	116
6. Summary.....	117
7. Literaturverzeichnis.....	118
Danksagung.....	133
Lebenslauf.....	134
Veröffentlichungen und Posterbeiträge	135
Erklärung.....	136

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
18S r	18-S-ribosomale RNA
³ H-Thymidin	Methyl [1',2'- ³ H]-Thymidin
A	Ampere
A. bidest	aqua bidestillatum (2-fach destilliertes Wasser)
A. dest	aqua destillatum (destilliertes Wasser)
Abb.	Abbildung
ACE	<i>angiotensin-converting enzyme</i>
Ag	Antigen
Ang	Angiotensin
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse
AS	Aminosäure
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor
AT ₂ -Rezeptor	Angiotensin II-Typ 2-Rezeptor
BMP-4	<i>bone morphogenetic protein</i> (morphogenetisches Knochenprotein)
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Ca ²⁺	Kalzium
CAM	<i>cell adhesion molecule</i> (Zelladhäsionsmolekül)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>mRNA complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CIDP	chronische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie
cm	Zentimeter
cm ²	Quadrarzentimeter
cGMP	zyklisches Guaninmonophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	<i>counts per minute</i> (registrierte radioaktive Zerfälle pro Minute)
C _T -Wert	<i>Threshold Cycle</i> (Schwellenwert-Zyklus)
Cy 3	Carbocyanin 3

DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat
DRG	<i>dorsal root ganglia</i> (Hinterwurzelganglien)
DTT	Dithiothreitol
EAN	experimentelle autoimmune Neuritis
ECM	<i>extracellular matrix</i> (extrazelluläre Matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat,
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
et al.	et alli (und andere)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Fluoreszenzaktivierte Zellzählung (Durchflusszytometrie))
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAP-43	<i>growth associate protein 43</i> (wachstumsassoziiertes Protein 43)
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GBS	Guillain-Barre-Syndrom
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor)
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
HRP	<i>horse-radish-peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
I-CAM1	<i>intracellular-adhesion molecule 1</i> (intrazelluläres Adhäsions-molekül 1)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase

I κ B	<i>inhibitory subunit of nuclear factor kappa B</i> (inhibitorische Untereinheit des Kernfaktors-kappa B)
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
KCL	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
l	Liter
LOX	<i>lectin-like oxidised LDL receptor</i>
LTP	<i>long-term potentiation</i> (Langzeitpotenzierung)
M	molar (Mol / l)
MAB	<i>monoclonal antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
MACS	<i>magnetic cell sorting with indirect MicroBeads</i> (magnetische Zell-Sortierung mittels Sekundärantikörper-gekoppelter Eisenpartikel)
MAG	<i>myelin associated glycoprotein</i> (Myelin-assoziiertes Glykoprotein)
MAP	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBP	<i>myelin basic protein</i> (basisches Myelinprotein)
mCi	Millicurie
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minuten
mm	Millimeter
MMP	Matrix Metalloproteinase
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure (Boten RNA)
μ m	Mikrometer
μ M	mikromolar
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaNO ₂	Natriumnitrit
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
N. ischiadicus	Nervus ischiadicus (Ischiasnerv)
N. fibularis	Nervus fibularis (Wadenbeinnerv)
Nn. ischiadici	Nervi ischiadici (Ischiasnerven)
N. opticus	Nervus opticus
N. tibialis	Nervus tibialis (Schienbeinnerv)
NF- κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i> (Kernfaktor-kappa B)

NGF	<i>nerve growth factor</i> (Nervenwachstumsfaktor)
nm	Nanometer
nm	Nanometer
NO	Stickoxid
NO ₂	Nitrit
NO ₃	Nitrat
NP 40	Tergitol®-Typ 40
NOS	NO-Synthase
NS	Nervensystem
OD	optische Dichte
o. g.	oben genannt
p	Wahrscheinlichkeit
P0	<i>protein zero</i> (Protein Null)
p75 ^{LNGFR}	<i>low affinity nerve growth factor receptor</i> (niedrigaffiner Rezeptor für den Nerven Wachstumsfaktor)
p75 ^{NTR}	<i>low affinity neutrophine receptor</i> (niedrigaffiner Neutrophinrezeptor)
PAI	<i>plasminogen activator inhibitor</i>
PBS	<i>phosphate buffer saline</i> (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PDL	Poly-(D)-Lysin
pg	Pikogramm
PLP	Proteolipid-Protein
PMP22	peripheres Myelin-Protein 22
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	peripheres Nervensystem
r	rückwärts (in Verbindung mit Angaben zu Primersequenzen)
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
s	Sekunden
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodezylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer

TBST	<i>Tris-buffered-saline-tween</i> (Tris-gepufferte Salz-Tween-Lösung)
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i> (transformierender Wachstumsfaktor)
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> (Tumornekrosefaktor)
TNF-RI	TNF-Rezeptor I (p55)
TNF-RII	TNF-Rezeptor II (p75)
TNF-Rs	TNF-Rezeptoren
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trk	Tyrosinkinase
Tween 20	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate
U	<i>unit</i> , Einheit der Enzymaktivität
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
v	vorwärts (in Verbindung mit Angaben zu Primersequenzen)
v / v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i> (vaskuläre glatte Muskelzellen)
w / v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1.1: Beteiligung der Schwann-Zellen am funktionellen Aufbau eines peripheren Nervs.....	2
Abb. 1.2: Übersicht über die Immunmechanismen, welche nach Verletzungen des PNS in die Immunprotektion involviert sind.....	11
Abb. 1.3: Schlüsselkomponenten des RAS.....	13
Abb. 1.4: Ang II-vermittelte Effekte.....	14
Abb. 2.1: Präparation der <i>Nn. ischiadici</i> und der Spinalganglien zur Schwann-Zell-Isolierung.....	25
Abb. 3.1: Phasenkontrastmikroskopische Darstellung einer repräsentativen primären Schwann-Zell-Kultur.....	58
Abb. 3.2: Lichtmikroskopische Darstellung von p75 ^{LNGFR} / DAB-gefärbten Schwannoma-Zellen.....	60
Abb. 3.3: Lichtmikroskopische Darstellung von p75 ^{LNGFR} / DAB-gefärbten primären Schwann-Zellen.....	60
Abb. 3.4: Lichtmikroskopische Darstellung einer p75 ^{LNGFR} / DAB-gefärbten Spinalganglien-Mischkultur.....	61
Abb. 3.5: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der p75 ^{LNGF} -Rezeptoren auf Schwannoma-Zellen.....	62
Abb. 3.6: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der p75 ^{LNGF} -Rezeptoren auf primären Schwann-Zellen.....	62
Abb. 3.7: Immunzytochemische Phänotypisierung einer repräsentativen p75 ^{LNGFR} / DAB-gefärbten Schwann-Zell-Kultur.....	64
Abb. 3.8: Durchflusszytometrische Charakterisierung einer repräsentativen Schwann-Zell-Kultur.....	66
Abb. 3.9: Expression von mRNA-Transkripten des AT _{1a} - und AT ₂ -Rezeptors in primären Schwann-Zellen und Schwannoma-Zellen sowie in Spinalganglien-Fibroblasten.....	68
Abb. 3.10: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der AT ₁ - und AT ₂ -Rezeptoren auf Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen.....	69
Abb. 3.11: Nachweis des Einflusses von Ang II auf die AT _{1a} - und AT ₂ -Rezeptor-mRNA-Expression in primären Schwann-Zellen mittels <i>realtime</i> -RT-PCR.....	71
Abb. 3.12: Untersuchung zum Einfluss von Ang II auf die mRNA-Expression des AT _{1a} - und des AT ₂ -Rezeptors in Spinalganglien-Fibroblasten mittels <i>realtime</i> -RT-PCR.....	72
Abb. 3.13: Untersuchung zum Einfluss von Ang II auf die Expression von AT _{1a} - und AT ₂ -Rezeptor-mRNA in den Schwannoma-Zellen von Co-Kulturen mittels <i>realtime</i> -RT-PCR.....	73
Abb. 3.14: Einfluss von Ang II auf die Synthese der Ang II-Rezeptor-Proteine.....	75

	Seite
Abb.3.15: In Ang II-stimulierten Schwannoma-Zellen wurde der Transkriptionsfaktor NF- κ B vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert.....	76
Abb. 3.16: Effekt von Ang II auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B.....	77
Abb. 3.17: Einfluss von Ang II auf das Proliferationsverhalten von Schwann-Zellen.....	78
Abb. 3.18: Einfluss von Ang II auf das Proliferationsverhalten von Spinalganglien-Fibroblasten. Spinalganglien-Fibroblasten.....	79
Abb. 3.19: Einfluss von Ang II auf das Proliferationsverhalten von Co-Kulturen.....	80
Abb. 3.20: Einfluss von Ang II-Rezeptorblockern auf die proliferationsfördernde Wirkung von Ang II in Schwannoma-Zellen.....	82
Abb. 3.21: Einfluss von Ang II-Rezeptorblockern auf die proliferationsfördernde Wirkung von Ang II.....	83
Abb. 3.22: Nachweis des Einflusses von Ang II auf die NGF-mRNA-Expression in oxidativ gestressten und ungestressten Schwann-Zellen mittels <i>realtime</i> -RT-PCR.....	85
Abb. 3.23: Einfluss von Ang II auf die Freisetzung von NGF.....	86
Abb. 3.24: Austestung des Einflusses von TNF- α und IFN- γ auf die Freisetzung von NO in den Zellkulturüberstand von Schwannoma-Zellen.....	87
Abb. 3.25: Einfluss von Ang II auf die Freisetzung von NO in den Zellkulturüberstand von Schwannoma-Zellen.....	89
Abb. 3.26: Expression von mRNA-Transkripten der iNOS.....	90
Abb. 3.27: Untersuchung einer möglichen Apoptose-Induktion in Schwann-Zellen durch Ang II.....	92
Abb. 3.28: Lichtmikroskopische Darstellung repräsentativer GAP-43-gefärbter Gefrier-Längsschnitte (5 μ m Schnittdicke) von <i>Nn. ischiadici</i> (A-D) sowie Darstellung der Myelinscheiden an semidünnen (1 μ m Schnittdicke) <i>Nn. ischiadici</i> -Querschnitten (a-d).....	95

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1.1: Ang II-Rezeptor-vermittelte Effekte	17
Tab. 2.1: In der semiquantitativen RT-PCR verwendete Primer	36
Tab. 2.2: In der TaqMan [®] <i>realtime</i> -RT-PCR verwendete Primer	39
Tab. 2.3: In der Sybr [®] Green <i>realtime</i> -RT-PCR verwendete Primer	40

1 Einleitung

1.1 Das periphere Nervensystem

Das Nervensystem (NS) von Vertebraten kann aufgrund verschiedener anatomischer und funktioneller Kriterien in ein Zentralnervensystem (ZNS) und ein peripheres Nervensystem (PNS) unterteilt werden. Dabei werden Gehirn und Rückenmark zum ZNS gezählt, während die Nervenzellansammlungen (Ganglien) und Hirnnerven außerhalb des ZNS dem PNS zugeordnet werden. Beide Nervensysteme arbeiten eng zusammen, wobei das PNS die Informationsvermittlung zwischen dem ZNS und den Effektor- und Rezeptorzellen übernimmt.

Für eine effektive Weiterleitung der Nervenimpulse sowie für den Erhalt und die Regeneration peripherer Nerven ist im Vertebraten-NS die Myelinisierung der Axone unabdingbar. Im PNS sind hierfür die myelinisierenden Schwann-Zellen verantwortlich. Diese Gliazellen des PNS bilden um alle großkalibrigen Axone, einschließlich der Motorneurone und einiger sensorischer Neurone, eine schützende, Impulse elektrisch weiterleitende Myelinscheide und sind somit maßgeblich am funktionellen Aufbau eines peripheren Nervs beteiligt (Bhatheja und Field, 2006; Melendez-Vasquez *et al.*, 2004; Wewetzer *et al.*, 1999).

In einem peripheren Nerven sind myelinisierte motorische und sensorische Nervenfasern sowie nichtmyelinisierte vegetative Nervenfasern vereinigt, die durch drei Bindegewebe (Endoneurium, Perineurium und Epineurium) gebündelt werden. Als Nervenfasern wird im PNS dabei der bis zu 1m lange gliazellumhüllte Hauptfortsatz (Axon) einer Nervenzelle (Neuron) bezeichnet. Die Beteiligung der Schwann-Zellen am Aufbau eines peripheren Nervs zeigt Abb. 1.1.

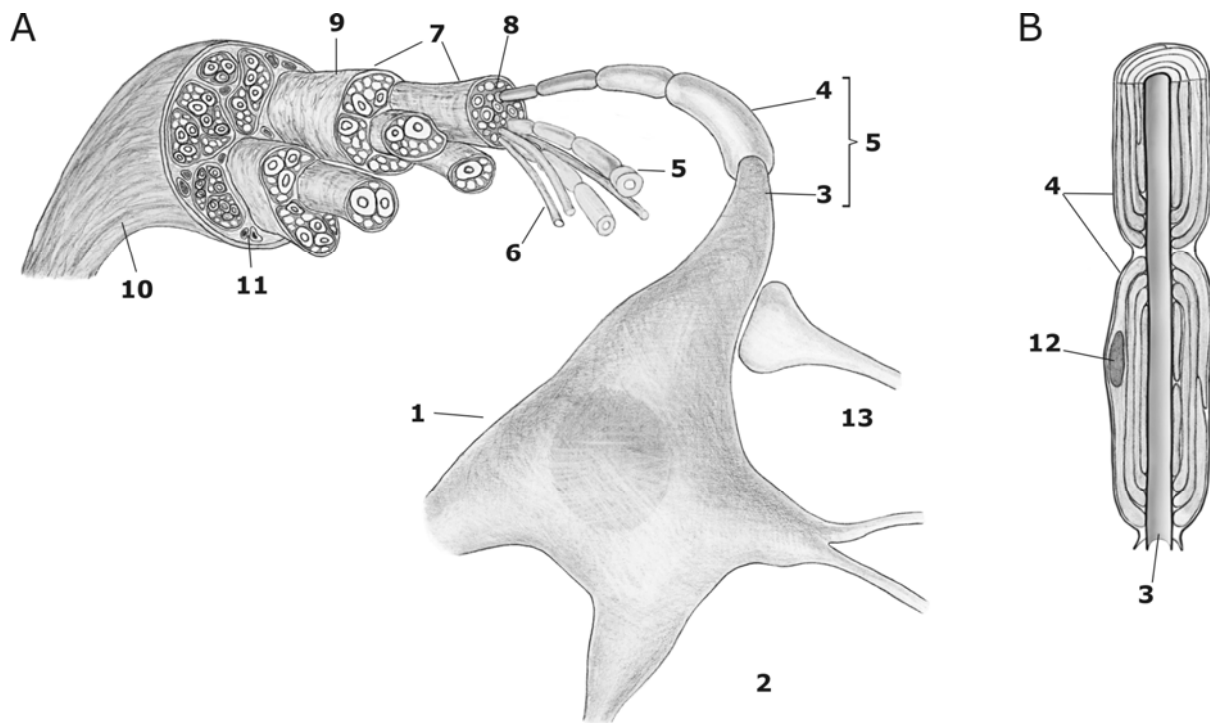


Abb.1.1: Beteiligung der Schwann-Zellen am funktionellen Aufbau eines peripheren Nervs.
A: Schematische Darstellung eines peripheren Nervs bis zur Nervenzelle. **B:** Schematische Darstellung eines längs geschnittenen myelinisierten Axons.

[1] Neuron mit [2] mehreren Dendriten und [3] einem gliazellumhüllten Axon, [4] Myelinscheide; [5] myelinisierte Nervenfasern, [6] nichtmyelinisierte Nervenfasern, [7] Nervenfaserbündel, [8] Endoneurium, [9] Perineurium, [10] Epineurium, [11] Bindegewebe mit eingelagerten Blutgefäßen, [12] Kern einer Schwann-Zelle.

1.2 Schwann-Zellen

1.2.1 Entwicklung der Schwann-Zellen

Embryologisch sind die Schwann-Zellen ektodermalen Ursprungs und entwickeln sich aus migrationsfähigen, multipotenten Stammzellen der Neuralleiste (Bhatheja und Field, 2006; Corfas *et al.*, 2004), welche aus dem Neuroepithel am dorsalen Ende des sich schließenden Neuralrohres stammen (LaBonne und Bronner-Fraser, 1999; Liem *et al.*, 1995). Die Auswanderung der Neuralleistenzellen vom Neuralrohr wird durch das vom Ektoderm sezernierte *'bone morphogenetic protein'* (BMP-4) induziert (Sela-Donenfeld und Kalcheim, 2000; Sela-Donenfeld und Kalcheim, 1999; Liem *et al.*, 1995). Dabei begleiten sie entweder die auswachsenden motorischen und sensorischen Nervenbündel in die Peripherie, oder sie beteiligen sich an der Bildung der sensorischen Hinterwurzelganglien. Bei ihrer Migration beginnen die Neuralleisten- und zukünftigen Schwann-Zellen unter axonaler Kontrolle zu proliferieren, um eine ausreichende Zellzahl für die Myelinisierung der Axone, die mit

der Geburt beginnt (Jessen und Mirsky, 2005), zu produzieren (Lai, 2005; Eccleston, 1992). Dabei ist bekannt, dass bei der Schwann-Zell-Proliferation Signalwege über zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Signalwege über die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) eine entscheidende Rolle spielen und beide Wege auch miteinander interagieren (Ogata *et al.*, 2006). Nach Erreichen ihres Zielgewebes, beginnen die Neuralleistenzellen unter dem neuronal sezernierten β -Neuregulin zu Schwann-Vorläuferzellen mit der charakteristischen flachen, epithelartigen Morphologie zu differenzieren (Lobsiger *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 1994) und exprimieren den niedrigaffinen Rezeptor für den Nerven Wachstumsfaktor (*low affinity nerve growth factor receptor*, p75^{LNGFR}) und das wachstumsassoziierte Protein 43 (*growth associate protein 43*, GAP 43) (Lobsiger *et al.*, 2000; Jessen *et al.*, 1994). In ihrer weiteren Entwicklung differenzieren die Schwann-Vorläuferzellen zu frühen Schwann-Zellen (Jessen *et al.*, 1994), was unter anderem durch die Ausbildung einer bipolaren Morphologie und der Expression des zytoplasmatischen Kalzium (Ca^{2+})-bindenden Proteins S100, als Marker für Schwann-Zellen, gekennzeichnet ist (Jessen und Mirsky, 1992). Aus den frühen Schwann-Zellen gehen später die nicht-myelinisierenden, die myelinisierenden und die perisynaptischen Schwann-Zellen hervor (Corfas *et al.*, 2004), wobei letztere als Mantelzellen die motorische Endplatte bedecken und maßgeblich am Zusammenhalt der motorischen Einheit beteiligt sind (Rochon *et al.*, 2001; Trachtenberg und Thompson, 1996; Son und Tompson, 1995). Ob sich eine Schwann-Zelle zu einer myelinisierenden oder nicht-myelinisierenden Schwann-Zelle weiterentwickelt, ist abhängig vom Kaliber des auswachsenden Axons, das sie während ihrer Migration begleitete. Langsam-leitende Axone schmalen Kalibers ($< 1 \mu\text{m}$) werden von nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen in kleinen Bündeln umschlossen und bleiben demzufolge unmyelinisiert (marklos). Die großkalibrigen ($> 1 \mu\text{m}$) schnell-leitenden Axone dagegen werden abschnittsweise von einzelnen myelinisierenden Schwann-Zellen unter Bildung einer Myelinscheide umhüllt (Lai, 2005; Sherman und Brophy, 2005; Lobsiger *et al.*, 2002) und werden als markhaltige Axone bzw. markhaltige Fasern bezeichnet. Die Dicke der Myelinscheide ist dabei proportional dem Axondurchmesser (Dietschy und Turley, 2004; Michailov *et al.*, 2004), was durch das axonal gebildete Protein Neuregulin-3 reguliert wird (Sherman und Brophy, 2005).

1.2.2 Die physiologische Funktion von Schwann-Zellen

Jede myelinisierende Schwann-Zelle ist mit nur einem Segment auf einem einzelnen Axon assoziiert und bildet hier eine, für die effiziente Leitung der Aktionspotentiale im Vertebraten-NS, essentielle Myelinscheide um das Axon (Pertusa *et al.*, 2007; Corfas *et al.*, 2004; Melendez-Vasquez *et al.*, 2004; Nickols *et al.*, 2003). Somit besteht die Gliahülle einer markhaltigen Nervenfasern aus zahlreichen, kettenförmig angeordneten Myelinscheiden. Die physiologisch myelinfreien Regionen zwischen benachbarten Myelinscheiden werden als 'Ranvier Schnürringe' bezeichnet und gewährleisten eine Steigerung der Reizleitungsgeschwindigkeit, indem sie eine Weiterleitung der Aktionspotentiale über die saltatorische Erregungsleitung ermöglichen (Melendez-Vasquez *et al.*, 2004).

Myelinscheiden bestehen aus zahlreichen Myelin-Lamellenstapeln, welche im PNS als Membran-Ausläufer von Schwann-Zellen mehrfach um die Axone gewickelt werden. Bei jeder Wicklung wird das Zytoplasma der Schwann-Zellen herausgedrückt, so dass die Membranen aufeinander liegen und durch Myelin-spezifische Proteine miteinander verklebt werden können, was zur Entstehung von kompaktem Myelin führt. Myelinscheiden bleiben immer Bestandteil der jeweiligen Gliazelle und fungieren als eine elektrisch isolierende Schicht aus Lipiden und Proteinen. Dabei machen die Lipide, wie z. B. Cholesterol, Cerebroside, Sulphatide, Phosphatidyl -ethanolamine, -choline, -inositole und -serine sowie die Sphingomyeline etwa 70 - 80 % des Myelin-Trockengewichtes aus (Inouye und Kirschner, 1988). Myelin enthält neben den Lipiden und Wasser auch eine Reihe von Proteinen, wie z. B. das Protein 0 (P0), das fettsäurebindende Protein 2 (P2), das periphere Myelin-Protein 22 (*peripheral myelin protein 22*, PMP22), das basische Myelin-Protein (*myelin basic protein*, MBP), Myelin-assoziierte Glykoproteine (*myelin-associated glycoproteins*, MAG) und das Gap junction-Protein Connexin 32, wobei diese Aufzählung nicht komplett ist (Snipes und Suter, 1995). Für die Entwicklung und den Erhalt des Myelins im PNS haben diese Proteine eine entscheidende Bedeutung und konnten in Schwann-Zellen als Glia-assoziierte Zelloberflächenmoleküle identifiziert werden (Martini und Schachner, 1997; Armati und Pollard, 1996). Dabei zählen die Proteine P0, PMP22 und MBP zu den strukturellen Myelinproteinen, die an der Bildung der hochorganisierten Myelinscheide beteiligt sind. Connexin 32 und MAG nehmen an den Interaktionen von Schwann-Zellen mit den Axonen oder an Schwann-Zell - Schwann-Zell-

Interaktionen teil (Shy, 2002). Gendefekte von P0, PMP22 und Connexin 32 haben gezeigt, dass diese Proteine für eine Vielzahl von hereditären sensorischen und motorischen Neuropathien verantwortlich sind (Armati und Pollard, 1996).

P0. P0 ist das vorherrschende Myelinprotein in Schwann-Zellen mit einem Molekulargewicht (MG) von 30 Kilodalton (kD) und macht als integrales Zelloberflächen-Glykoprotein 50 - 60 % der totalen Proteinmenge im PNS aus. Es ist Mitglied der Immunglobulin (Ig)-Supergen-Familie mit einer extrazellulären Domäne (Shy, 2006). Das Gen für P0 ist auf 1q22–q23 des Chromosoms 1 beim Menschen lokalisiert (Hayasaka *et al.*, 1993) und in sechs Exons eingeteilt, die über 7 Kilobasen (kb) der DNA verteilt sind (Lemke *et al.*, 1988). P0 kann als Adhäsionsmolekül agieren und vermittelt sowohl heterophile als auch homophile Zell-Zell-Interaktionen (Shy, 2006; Martini und Schachner, 1997). Es ist in die Axon-Integrität sowie in die Verdichtung und den Erhalt des Myelins involviert und trägt zusammen mit MBP zur Dicke des Myelins im PNS bei (Shy, 2006; Shy *et al.*, 2002; Martini und Schachner, 1997).

P2. P2 hat ein MG von 15 kD und enthält drei einzelne Domänen. Es ist verwandt mit der Familie der zytoplasmatischen Lipid-bindenden Proteine. Die quantitative Expression von P2 im PNS ist Spezies-abhängig: von < 1 % in Nagetieren bis 14 % in Spinalganglien von Rindern (Greenfield *et al.*, 1973).

PMP22. PMP22 ist ein sehr hydrophobes Molekül mit vier potentiellen Transmembrandomänen und hat ein MG von 22 kD. Strukturell ähnelt das Protein einem Ionenkanal. Die höchsten PMP22-Spiegel sind in myelinisierenden Schwann-Zellen nachgewiesen worden. PMP22 ist am Erhalt der Axon - Schwann-Zell-Integrität (Martini und Schachner, 1997), an der Verdichtung des Myelins und an der Bildung der hochorganisierten Myelinscheiden beteiligt (Berger *et al.*, 2006). Es scheint, dass PMP22 in die Modulation des Zellzyklus von Schwann-Zellen *in vitro* involviert ist (Martini und Schachner, 1997). So zeigten *in vitro* Untersuchungen, dass erhöhte PMP22-mRNA-Spiegel zu einer reduzierten Schwann-Zell-Proliferation führen. Umgekehrt, führt ein reduzierter PMP22-mRNA-Spiegel zu einer verstärkten Schwann-Zell-Proliferation (Zoidl *et al.*, 1995).

MBP. MBP gehört zu einer Klasse von Proteinen mit einem MG zwischen 12 und 22 kD (Greenfield *et al.*, 1982; Barbarese *et al.*, 1977), welche von einem einzigen Gen abstammen und durch alternatives RNA-*Splicen* entstehen. Die spezifische Verwendung der MBP-Exons ist dabei Spezies-abhängig. MBP gehört zur Gruppe der elektrisch geladenen, löslichen intrazellulären Myelin-Proteine und macht schätzungsweise 35 % der Myelin-Proteine im ZNS und 15 - 20 % der Myelin-Proteine im PNS aus. Die 18,5 kD Isoform des MBP ist die Hauptkomponente in den Myelinscheiden höherer Vertebraten. Jedoch ist das MBP für die Myelinbildung im PNS nicht unbedingt erforderlich, da diese hauptsächlich durch die Proteine PMP22, P0 und P2 induziert wird und diese Myelinproteine das Fehlen von MBP kompensieren können (Harauz *et al.*, 2004; Boggs, 2006).

MAG. MAG sind integrale Membran-Glykoproteine mit 5 Ig-ähnlichen Domänen und einem MG von etwa 100 kD. Als Polypeptide kommen sie in zwei Formen, den S-MAG mit einem Gewicht von 67 kD und den L-MAG mit einem Gewicht von 72 kD, vor. MAG sind im PNS in die Myelinbildung involviert (Armati und Pollard, 1996), machen aber nur einen geringen Anteil im peripheren Myelins aus. Sie sind auf das Zytoplasma beschränkt (Martini und Schachner, 1997) und üben eine inhibitorische Wirkung auf die Axonregeneration aus (McKerracher *et al.*, 1994; Mukhopadhyay *et al.*, 1994).

Connexin 32. Connexin 32, mit einem MG von 32 kD, besitzt vier hydrophobe Transmembrandomänen. Es ist in der Lage, hochorganisierte Hexamere (Connexone) in der Zellmembran zu bilden und ist für den Erhalt der peripheren Myelinscheiden von Bedeutung. Nachgewiesen wurde das Molekül im nicht-kompakten Myelin: in Schmidt-Lanterman-Einkerbungen und in paranodalen Schleifen der myelinisierenden Schwann-Zellen (Ressot und Bruzzone, 2000; Martini und Schachner, 1997).

PLP. PLP ist ein Protein mit vier hydrophoben Transmembrandomänen. Es wird vom PLP-Gen in zwei Isoformen verschlüsselt: dem PLP und dem PLP/DM-20. Das PLP ähnelt einem Kanalprotein und ist im Myelin des ZNS vorherrschend. Funktionell dient das PLP der Verdichtung und Stabilisierung des Myelins. In das periphere Myelin wird es nicht inkorporiert, wurde aber in Schwann-Zellen nachgewiesen (Martini und Schachner, 1997; Snipes und Suter, 1995).

In früheren Studien wurde gezeigt, dass der Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth faktor*, NGF) eine Rolle bei der Regulation von Myelinisierungsprozessen spielen könnte, weil er in Schwann-Zellen die Myelinbildung stimuliert. Das Signal zur Heraufregulation der Myelinisierung kommt dabei vom Axon als Antwort auf die Bindung von NGF an den axonalen Tyrosinkinase A (TrkA)-Rezeptor (Sherman und Brophy, 2005).

1.2.3 Schwann-Zellen als immunkompetente Zellen

Die Immunfunktionen von Schwann-Zellen wurden *in vitro* gut untersucht (Gold *et al.*, 1999). Schwann-Zellen exprimieren Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*; MHC) (Armati und Pollard, 1996) und können somit als Antigen-präsentierende Zellen fungieren und zum lokalen Immunnetzwerk beitragen (Wekerle *et al.*, 1986). Außerdem produzieren Schwann-Zellen die Adhäsionsmoleküle I-CAM1, L1, L2-HNK-1, Ng-CAM und N-Cadherisin, die Zytokine Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), den transformierenden Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor- β* , TGF- β) sowie die inflammatorischen Moleküle Tumornekrosefaktor- α (*tumor necrosis factor α* , TNF- α), Prostaglandin E₂ und Thromboxan A₂ (Kieseier *et al.*, 2006; Armati und Pollard, 1996).

Immunkompetente Schwann-Zellen können mit T-Zellen und Makrophagen interagieren und damit eine lokale Entzündungsreaktion im PNS hervorrufen. Dabei bestimmen die Interaktionen des humoralen und zellulären Immunsystems mit den zellulären und extrazellulären Komponenten des PNS, das Ausmaß der Entzündung und der möglichen Reparaturmechanismen, wie z. B. der Remyelinisierung oder das Aussprossen neuer Nervenfasern (Mäurer *et al.*, 2002; Gold *et al.*, 1999).

MHC und MHC-Moleküle. Der MHC ist eine organisierte Gruppe fest vernetzter Gene mit immunologischen und nicht-immunologischen Funktionen und kommt in allen Vertebraten vor. Die primäre Funktion des MHC ist die Kodierung von spezialisierten Rezeptor-Glykoproteinen, den MHC-Molekülen der Klasse I (MHC I-Moleküle) und der Klasse II (MHC II-Moleküle) sowie die Kodierung einiger Plasmaproteine, den MHC-Molekülen der Klasse III (MHC III-Moleküle). Die MHC I- und MHC II-Moleküle sind an der hochspezifischen Erkennung von Fremdstoffen durch T-Zellen beteiligt (Borenstein *et al.*, 2000). Ihre Aufgabe besteht

darin, den T-Zellen Antigene in Form prozessierter, gebundener Peptide zu präsentieren (Dukkipati *et al.*, 2006) und damit die Erkennung von „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ zu gewährleisten. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten in *in vitro* Studien, dass humane und Ratten-Schwann-Zellen geringe Spiegel an MHC I-Molekülen exprimieren (Gold *et al.*, 1995; Bergsteinsdóttir *et al.*, 1992; Armati *et al.*, 1990; Samuel *et al.*, 1987). Eine signifikante Anzahl an MHC II-Molekülen konnte in Anwesenheit aktivierter T-Zellen nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) detektiert werden (Lisak *et al.*, 1997; Gold *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 1991; Armati *et al.*, 1990; Kingston *et al.*, 1989).

1.3 Waller-Degeneration

Eine Verletzung peripherer Nerven, z. B. infolge einer Quetschung oder einer Axotomie, setzt eine Kaskade von zellulären und molekularen Mechanismen in Gang, die zusammen als Waller-Degeneration beschrieben werden. Diese umfasst eine Reihe, zum Teil gleichzeitig stattfindender aber auch nacheinander ablaufender Phasen, während der der distale Nervenstumpf degeneriert, die Myelinscheiden abgebaut und die Myelinreste phagozytiert werden (Hall, 1997; Fawcett und Keynes, 1990). Die mit diesem Prozess einhergehenden morphologischen Veränderungen betreffen hauptsächlich das distale Ende des verletzten Nerven (Hall, 1997; Clatworthy *et al.*, 1995; Fawcett und Keynes, 1990), während der proximal von der Verletzungsstelle liegende Abschnitt den Ausgangspunkt für neuroregenerative Prozesse bildet.

Die Waller-Degeneration selbst stellt eine starke inflammatorische Antwort auf eine neuronale Verletzung dar, in die Schwann-Zellen, Makrophagen, und inflammatorische Mediatoren involviert sind. Sie setzt den Ausgangspunkt für den Erfolg oder Misserfolg einer anschließenden Nerven-Regeneration (Shamash *et al.*, 2002; Créange *et al.*, 1997; Brück *et al.*, 1996; Fernández-Valle *et al.*, 1995; Chaudhry *et al.*, 1992.) Für eine erfolgreiche Regeneration des verletzten Axons ist jedoch das Überleben der Nervenzelle die erste Voraussetzung. Dieses wiederum ist abhängig von der Art der Nervenzelle, ihrem Alter, der Verletzungsart, der Entfernung der Verletzung vom Zell-Soma (Fansa und Keilhoff, 2003) sowie von der Anwesenheit ansässiger Schwann-Zellen.

1.3.1 Schwann-Zellen als Immunmodulatoren der Waller-Degeneration und ihr Einfluss auf neuroregenerative Prozesse

Der Ablauf einer klassischen Entzündung im NS wurde in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen, wie dem Guillain-Barre-Syndrom (GBS) und der chronischen demyelinisierenden Polyradikuloneuropathie (CIDP), sowie nach Infektionen des NS untersucht. Als Tiermodell für GBS und CIDP gilt dabei die experimentelle autoimmune Neuritis (EAN) (Gold *et al.*, 1999). Neuere Beobachtungen im Tiermodell zeigten, dass dieselben Zytokine, welche die schädigenden Effekte während einer autoimmunen Demyelinisierung verursachen, auch im distalen Nervenstumpf während der Waller-Degeneration exprimiert werden. Diese Zytokine haben auch die Kapazität, multiple und gegensätzliche Effekte, wie z. B. Degeneration, Schutz und Regeneration auszuüben (Correale und Villa, 2004).

In der Abfolge der Ereignisse einer Waller-Degeneration kommt es zunächst, durch den Läsions-bedingten Abbruch des Kontaktes zwischen distalem Axon und Soma der Nervenzellen, zu einer Unterbrechung der Versorgung des Axons und damit zum Untergang von Axoplasma und Axolemm. Dieser Vorgang wird durch axonale Proteasen und den Einstrom von Ca^{2+} induziert (George *et al.*, 1995). Der axonale Verlust bewirkt in den Schwann-Zellen unter anderem eine Herabregulation der Myelin-spezifischen Gene, so dass die Myelin-typischen Proteine und Lipide nicht mehr synthetisiert werden. Daraufhin zerfallen die Myelinscheiden (Gould, 1990) und deren Reste werden von ansässigen Schwann-Zellen phagozytiert (Stoll *et al.*, 1989). Innerhalb der ersten 24 Stunden einer ablaufenden Waller-Degeneration werden im distalen Nervenstumpf Transkripte folgender Zytokine heraufreguliert: Interleukin (IL)-1 α/β , IL-6 und IL-10, welche hauptsächlich von aktivierten Schwann-Zellen (Bourde *et al.*, 1996; Jander *et al.*, 1996; Bolin *et al.*, 1995; Stoll *et al.*, 1993; Rotshenker *et al.*, 1992) und ansässigen Makrophagen zusammen mit TNF- α in der frühen Phase der Waller-Degeneration sezerniert werden (George *et al.*, 2004; Mueller *et al.*, 2003; Shamash *et al.*, 2002; Stoll *et al.*, 1993; Oldfors, 1980). TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin (Zhang und Huang, 2006) und spielt eine wichtige Rolle bei proliferativen und apoptotischen Vorgängen, welche durch den TNF-Rezeptor 1 (p55) oder den TNF-Rezeptor 2 (p75) vermittelt werden. Sowohl p55 als auch p75 werden in Schwann-Zellen und in Neuronen exprimiert. Der Rezeptor p55 spielt eine Hauptrolle bei der NF- κ B Aktivierung. Die Expression des TNF- α -Gens wird dabei über aktiviertes NF- κ B autoreguliert (Gosselin und Rivest,

2007; Widera *et al.*, 2006a). Die Heraufregulation von TNF- α im Endoneurium des distalen Nervenstumpfs übt eine wichtige Funktion bei der Rekrutierung von Makrophagen aus, die an der Beseitigung der Myelinreste durch Phagozytose beteiligt sind. So kommt es in TNF- α -Knockout-Mäusen zu einer verzögerten Makrophagen-Rekrutierung und damit auch zu einem verzögerten Myelinabbau (Liefner *et al.*, 2000; Stoll *et al.*, 1993). Überdies produzieren die Makrophagen noch weitere proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 und TNF- α ebenso wie die antiinflammatorische Zytokine IL-10 und TGF- β sowie Stickoxid (NO). Der Einstrom hämatogener Makrophagen in das Verletzungsgebiet, verbunden mit einer weiteren Produktion von TNF- α und NO, geht mit Schmerz einher (Levy und Zochodne, 2004; Wagner *et al.*, 1998; Wagner und Myers, 1996a; Wagner und Myers, 1996b). Die Freisetzung von TNF- α und NO tragen mit dazu bei, die Apoptose in den T-Zellen zu fördern, welche innerhalb von 2 Tagen nach einer Nervenläsion das Verletzungsgebiet infiltrieren (Jander *et al.*, 2001; Stoll *et al.*, 1989).

Durch das synergetische Agieren von IL-1 α/β und TNF- α (Hattori *et al.*, 1994) wird indirekt das Wachstum und Überleben des verletzten peripheren Nerven reguliert. Auf der einen Seite wird dadurch in Schwann-Zellen und ansässigen Fibroblasten eine erhöhte Expression des Neurotrophins NGF induziert (Correale und Villa, 2004; Meyer *et al.*, 1992; Heumann *et al.*, 1987; Lindholm *et al.*, 1987). Neurotrophine können axonales Neuwachstum induzieren (Asakura und Rodriguez, 1998) und damit einen bedeutenden Einfluss auf die Neuroregeneration nach dem Prozess der Waller-Degeneration nehmen. Auf der anderen Seite wird die weitere Produktion von IL-10 stimuliert, wodurch die Waller-Degeneration und die inflammatorische Antwort in Kombination mit TGF- β inhibiert werden. In der späten Phase der Waller-Degeneration sezernieren Schwann-Zellen und Fibroblasten das Zytokin IL-6 und den '*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*' (GM-CSF) (Reichert *et al.*, 1996; Saada *et al.*, 1996). IL-6 und GM-CSF werden mit der Unterstützung axonalen Wachstums in Verbindung gebracht und sind verantwortlich für eine Reduktion der TNF- α -Produktion nach den ersten Tagen der stattfindenden Waller-Degeneration (Correale und Villa, 2004; Be'eri *et al.*, 1998).

Nachdem Schwann-Zellen und Makrophagen den Myelinabfall phagozytiert und die Reste des distalen Axonabschnittes abgebaut haben (Brück, 1997; Fernandez-Valle, 1995; Perry und Brown, 1992; Bigbee *et al.* 1987; Beuche und Friede, 1984), ist die Waller-Degeneration beendet. Die Schwann-Zellen verbleiben in der Basallamina

und beteiligen sich von dort aus an weiteren Regenerationsprozessen, denn anders als im ZNS haben die Nerven im PNS die Möglichkeit zur Regeneration. Einen zusammenfassenden Überblick über die immunmodulatorische Rolle von Schwann-Zellen nach einer peripheren Nervenverletzung zeigt Abb. 1.2.

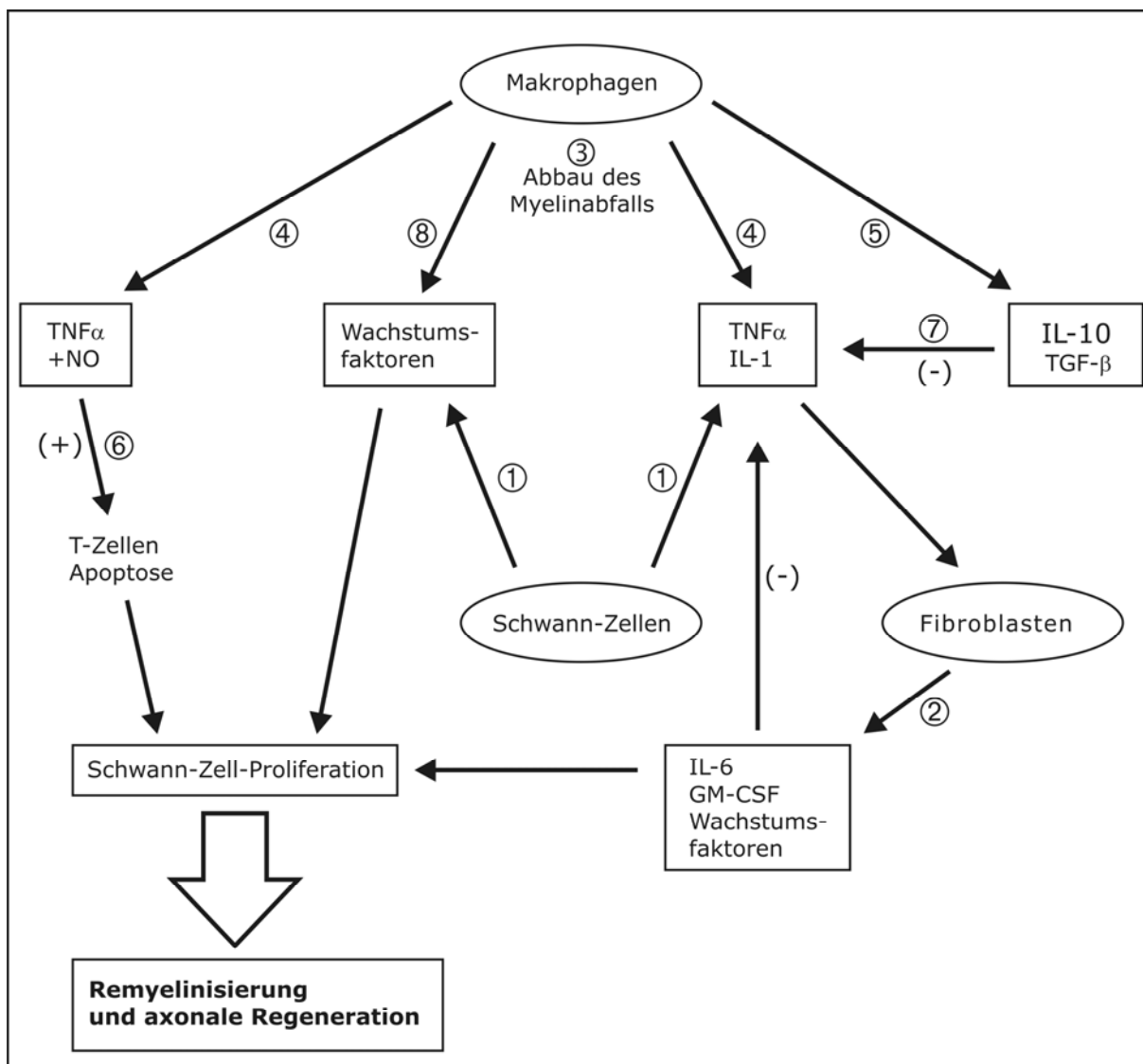


Abb. 1.2: Übersicht über die Immunmechanismen, welche nach Verletzungen des PNS in die Immunprotektion involviert sind. [1] Schwann-Zellen induzieren die Produktion von Wachstumsfaktoren, $TNF\alpha$ und IL-1. [2] Ansässige Fibroblasten produzieren IL-6, GM-CSF und Wachstumsfaktoren. [3] Rekrutierte Makrophagen sind in der Lage, die Myelinablagerungen zu entfernen und [4] proinflammatorische Zytokine, wie $TNF\alpha$ und IL-1 sowie [5] anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10 and TGF- β zu generieren. [6] Makrophagen fördern die T-Zell-Apoptose, [7] inhibieren die inflammatorische Antwort durch die Sekretion von IL-10 und TGF- β und [8] sezernieren verschiedener Wachstumsfaktoren, wodurch sie einen Beitrag zur Nervenregeneration leisten (verändert nach Correale und Villa, 2004).

Mit dem Verlust des axonalen Kontaktes nach einer peripheren Nervenverletzung ist die Umwandlung der myelinisierenden Schwann-Zellen zu regenerationsfördernden Zellen verbunden. Dabei kommt es in den Schwann-Zellen einerseits zu einer verminderten Produktion von Substanzen, die zur Myelinisierung und Aufrechterhaltung des Myelins notwendig sind und andererseits zu einer verstärkten Sekretion von Wachstumsfaktoren und zur Schwann-Zell-Proliferation (Fansa und Keilhoff, 2003) Die entstehenden de-differenzierten Tochterzellen bilden, indem sie sich aneinanderlagern, 'Büngnersche Bänder'. Diese dienen den proximal neuauswachsenden Axonen als Leitschienen, um letztlich die Verletzungsstelle zu überwinden und an den distalen Nervenstumpf anzuknüpfen (Hall, 1997, Fawcett und Keynes, 1990). Eine wichtige Rolle dabei spielt auch das 'Marker-Protein' für neuaussprossende Axone GAP-43 (Schicho *et al.*, 1999; Meiri *et al.*, 1988), dem ebenso wie einigen Hormonen, z. B. Schilddrüsenhormonen, Insulin, Östrogen, Testosteron, Corticotropin und dem Peptidhormon und Effektorprotein des Renin-Angiotensin-Systems 'Angiotensin II' (Ang II), neuroregenerative Eigenschaften zugeschrieben werden (Toth, 2006; Ahmed *et al.*, 2006; Bijlsma *et al.*, 1984). So zeigten *in vivo* Untersuchungen am 'Quetschläsions-Modell' des N. opticus der Ratte, dass Ang II das Neuauswachsen von Neuriten induzieren und somit axonale Regenerationsprozesse positiv beeinflussen kann (Lucius *et al.*, 1998).

1.4 Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ein wichtiges regulatorisches System für kardiovaskuläre und renale Funktionen (Schmieder *et al.*, 2007). Es konnte in verschiedenen Organen, wie dem Herzen, der Niere, den Nebennieren und dem Gehirn nachgewiesen werden (Montani und van Vliet, 2004). Auch für Schwann-Zellen ist ein lokales RAS bekannt. So detektierten Bleuel *et al.* (1995) die mRNA für Angiotensinogen und Renin in kultivierten Schwann-Zellen und vermuteten daher eine endogene Produktion von Ang II.

Angiotensinogen ist der Startpunkt des RAS. Es wird durch eine Protease, dem Enzym Renin, zum Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) gespalten, welches durch Abspaltung zweier weiterer AS durch das proteolytische '*angiotensin-converting enzyme*' (ACE) zum Oktapeptid Ang II umgewandelt wird. Das neuroaktive Fragment Angiotensin (1–7) (Ang-(1–7)) kann zum einen durch Spaltung von Ang I über eine Gewebe-spezifische Endopeptidase (Hallberg und Nyberg, 2003; Chappell *et al.*,

1990) und zum anderen durch Abspaltung von Phenylalanin-Resten aus Ang II entstehen (von Bohlen und Halbach *et al.*, 2006; Ferrario, 2006) und in einem weiteren Schritt zum Ang-(1-5) synthetisiert werden. Ang-(1-9) kann durch das ACE2 aus Ang I gebildet werden. Den Zusammenhang der Schlüsselkomponenten des RAS zeigt Abb. 1.3.

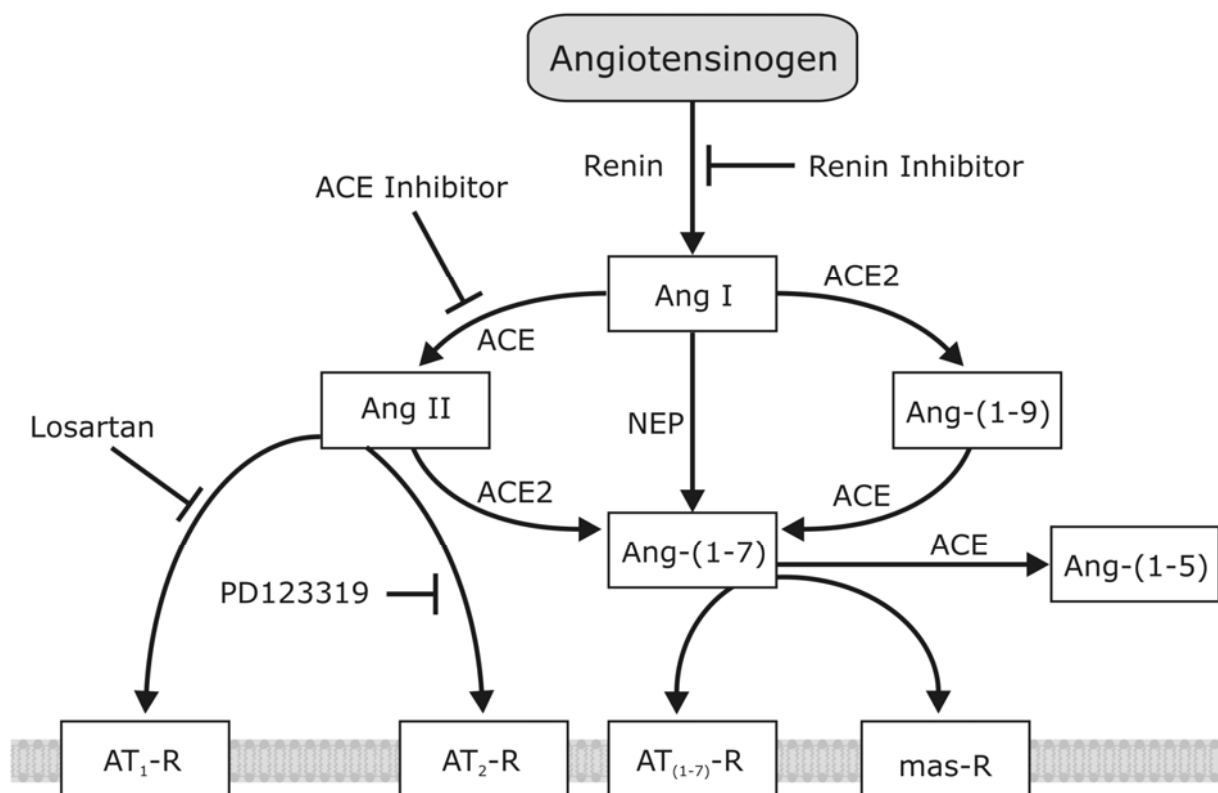


Abb. 1.3: Schlüsselkomponenten des RAS. Angiotensinogen ist der Startpunkt des RAS. Durch die Aktivität von Renin wird Ang I aus Angiotensinogen generiert. Ang I kann durch das proteolytische Enzym ACE zum Ang II gespalten werden. Ang II interagiert mit 2 Rezeptoren, dem AT₁- (AT₁-R) und dem AT₂-Rezeptor (AT₂-R). Ein spezifischer Blocker vom AT₂-Rezeptor ist PD 123319. Der AT₁-Rezeptor kann durch Losartan inhibiert werden. Ang-(1-5), Ang (1-7) und Ang-(1-9) sind ebenfalls Teil des RAS und können wichtige biologische Aktivitäten haben (verändert nach Ferrario, 2006).

1.4.1 Das Peptidhormon Ang II

Das Peptid-Hormon Ang II wird in zahlreichen Geweben, wie den meisten peripheren Organen und dem Gehirn, gebildet. Es ist das wichtigste Effektormolekül im RAS und induziert u.a. Vasokonstriktion, Aldosteronfreisetzung sowie Natrium- und Wasserretention. Zudem hat es eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Blutdruckes und der Flüssigkeitshomeostase (Page, 1987). Das lokale Ang II-System wird unabhängig vom klassischen RAS reguliert (Saavedra, 2005). Eine Zusammenfassung der Ang II-Effekte zeigt Abb. 1.4.

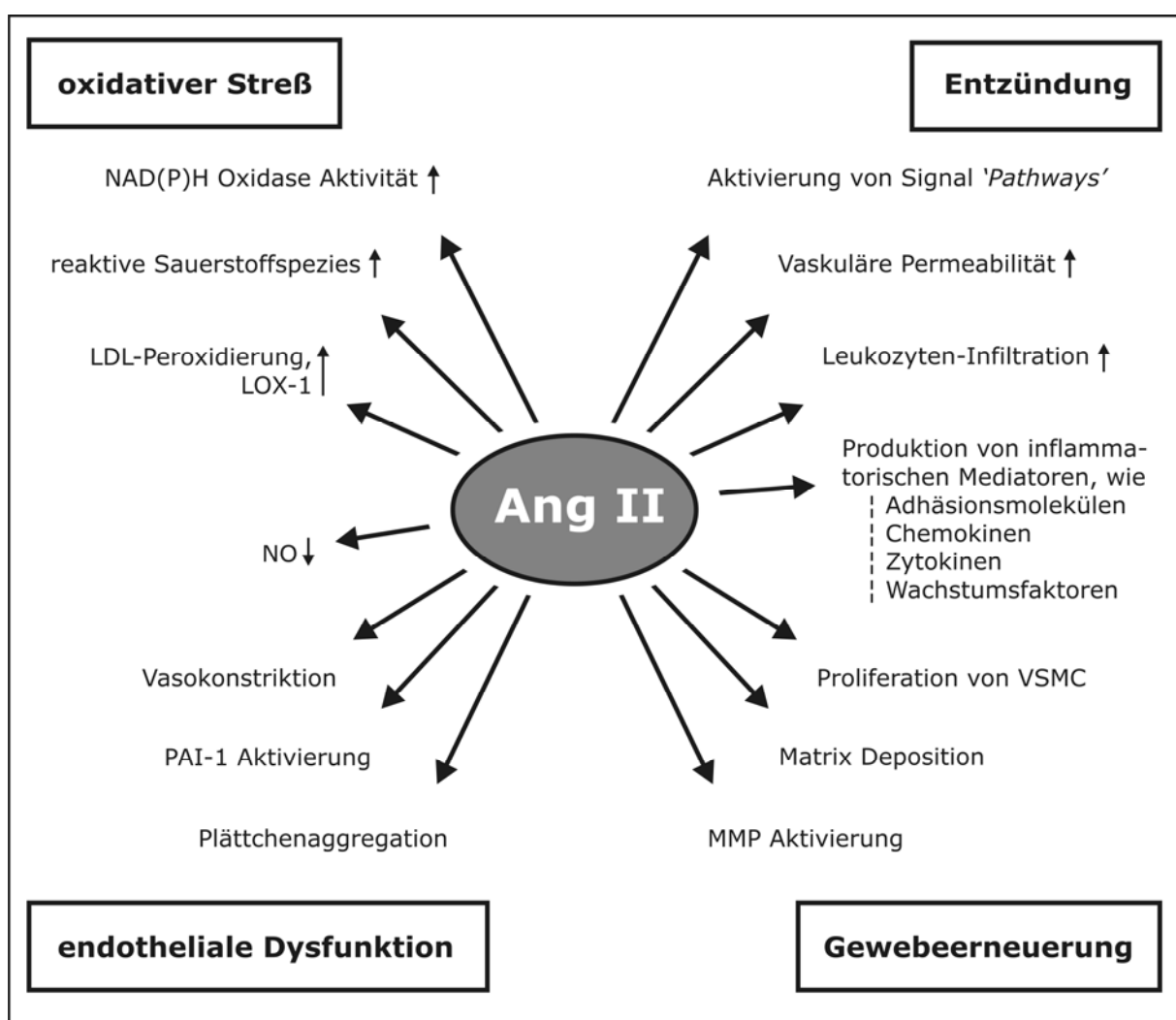


Abb. 1.4: Ang II-vermittelte Effekte. LOX-1 = (*lectin-like oxidised LDL receptor*), MMP = Matrix Metalloproteinase (*matrix metalloproteinases*), PAI-1 = Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (*plasminogen activator inhibitor*). VSMC = vaskuläre glatte Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*) (verändert nach Dandona *et al.*, 2007; Schmieder *et al.*, 2007).

1.4.2 Ang II und seine Rezeptoren

Die Effekte aller Angiotensin-Peptide werden durch spezifische Oberflächenrezeptoren vermittelt (Schmieder *et al.*, 2007). Ang II hat eine hohe Bindungsaffinität zu seinen AT₁- und AT₂-Rezeptoren (Daniels *et al.*, 2007; Oro *et al.*, 2007; Saavedra, 2005), wobei die bekanntesten physiologischen und pathophysiologischen Effekte von Ang II durch den AT₁-Rezeptor vermittelt werden. Beide Rezeptortypen sind Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren und gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (Saito *et al.*, 2008; Daniels *et al.*, 2007; Oro *et al.*, 2007; Tuccinardi und Martinelli, 2007; Saavedra, 2004; Hjorth *et al.*, 1994). Auch in Schwann-Zellen konnten sowohl AT₁-Rezeptoren als auch AT₂-Rezeptoren nachgewiesen werden (Bleuel *et al.*, 1995).

AT₁-Rezeptor. Die Expression des AT₁-Rezeptors konnte in einer Vielzahl von Geweben, wie den Nebennieren, dem Gehirn, dem Herzen, der Niere und der Prostata gezeigt werden. Auch in kardiovaskulären Zell-Typen, wie den VSMC, den Endothelzellen, den kardialen Myozyten und den kardialen Fibroblasten, wird der AT₁-Rezeptor exprimiert (Elton und Martin, 2007). Das humane AT₁-Gen ist auf Chromosom 3q lokalisiert und kodiert für ein Protein von 40-42 kD mit 359 AS. Die meisten Arten exprimieren ein einzelnes autosomales AT₁-Gen, allerdings wird bei Nagetieren zwischen dem AT_{1a}-Rezeptor und dem AT_{1b}-Rezeptor differenziert (Elton und Martin, 2007; von Bohlen und Halbach *et al.*, 2006). Die Gene für diese Rezeptor-Subtypen liegen bei der Ratte auf Chromosom 17 für den AT_{1a}-Rezeptor und auf Chromosom 2 für den AT_{1b}-Rezeptor. In der Maus sind diese Gene auf den Chromosomen 13 (AT_{1a}-Rezeptor) und Chromosom 3 (AT_{1b}-Rezeptor) lokalisiert. Auch die AT₁-Rezeptoren in Ratte und Maus sind Proteine mit einer Länge von 359 AS.

Die transkriptionelle Regulation der AT₁-Rezeptor-Genexpression läuft über Cyclosporine, Glukokortikoide, Wachstumshormone, Interleukine (IL-1 und IL-6), Progesteron, TNF- α und über das C-reaktive Protein. Diese Moleküle aktivieren das AT₁-Rezeptor-Gen. Gesteigerte Transkriptionsraten führen zu einer Heraufregulation der mRNA für den AT₁-Rezeptor und damit verbunden zu einer erhöhten Expression des AT₁-Rezeptors. Eine Aktivierung durch Ang II verstärkt die AT₁-Rezeptor-Dichte und führt zu einem erhöhten ‚*signaling*‘, welches vaskuläres ‚*remodeling*‘, endotheliale Dysfunktion, Inflammation und Hypertension nach sich zieht. Im

Gegensatz dazu vermindern Interferon- γ , NO, Statine und Thyroidhormone die Gentranskriptionsrate des AT₁-Rezeptors. Diese Stimuli führen zu einer reduzierten AT₁-Rezeptorexpression mit kardiovaskulären Erkrankungen (Elton und Martin, 2007). AT₁-Rezeptoren sind sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert. Zudem haben diese Rezeptoren auf die norepinephrine, GABAerge und / oder glutaminerge Transmission Einfluss. Weiterhin ist der AT₁-Rezeptor in die Langzeitpotenzierung (*long-term potentiation*, LTP) involviert. Diese spezifische Form der synaptischen Plastizität ist an Prozessen wie Lernen und Gedächtnis beteiligt (Oro *et al.*, 2007; von Bohlen und Halbach und Albrecht, 2006).

Eine Aktivierung des AT₁-Rezeptors führt zu einer Stimulation der Phospholipase C - Inositol 1,4,5-trisphosphat - Diacylglycerol (DAG)-Kaskade, der Stimulation der MAP-Kinase - extrazellulären Signal-regulierten Kinasen, der Stimulation von Trk und RhoA / Rho-Kinasen. Gleichzeitig werden pathophysiologische Effekte durch die Stimulation der Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS), welche durch einen reduzierten Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) - Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP)-Oxidase-abhängigen Mechanismus verursacht werden, vermittelt. ROS beeinflussen so genannte *downstream* Signalmoleküle, wie Transkriptionsfaktor, Trk/ Phosphatasen, Ca²⁺-Kanäle und MAP-Kinasen (Daniels *et al.*, 2007; Elton und Martin, 2007).

AT₂-Rezeptor. Der AT₂-Rezeptor wird, wie der AT₁-Rezeptor, in den Nebennieren, im Herzen, in Endothelzellen und im Uterus adulter Individuen exprimiert (Stoll *et al.*, 1995; Stecklings *et al.*, 1992; Obermüller *et al.*, 1991). Darüber hinaus ist er der vorherrschende Rezeptor-Typ in der Bauchspeicheldrüse, im Nebennierenmark, im Uterus, in den Granulosazellen der Eierstöcke sowie in fetalem Gewebe (Grady *et al.*, 1991). Der Rezeptor ist zu 32 – 34 % homolog mit dem AT₁-Rezeptor. Das humane AT₂-Gen ist auf dem X Chromosom lokalisiert und kodiert für ein Protein, bestehend aus 363 AS. Während die Sequenzen von Ratte und Maus zu 99 % identisch sind, besteht zwischen Ratte und humaner Form nur eine 72 %ige Sequenz-Identität. Der AT₂-Rezeptor reguliert verschiedene Funktionen in den Neuronen, u. a. den Ioneneinstrom, Zelldifferenzierung, axonale Regeneration und den programmierten Zelltod. Dabei kommt es zur Inhibition von MAP-Kinasen. Des Weiteren sind GABA_A-Rezeptoren in die Vermittlung der Ang II-induzierten Effekte bei der neuronalen Aktivität involviert (von Bohlen und Halbach und Albrecht, 2006).

Über den AT₂-Rezeptor wird das Kinin-NO-cGMP-System aktiviert sowie Proteinphosphatasen stimuliert.

Eine Zusammenfassung der pharmakologischen Effekte von Ang II, welche über die AT₁- und AT₂-Rezeptoren vermittelt werden, zeigt Tab. 1.1.

Tab. 1.1: Ang II-Rezeptor-vermittelte Effekte. (verändert nach Ferrario, 2006).

AT ₁ -Rezeptor	AT ₂ -Rezeptor
<ul style="list-style-type: none"> • Vasokonstriktion (über ↓NO, ↑ intrazelluläres Ca²⁺, ↑ Superoxid) • Inflammation (über ↑NF-κB) • Zellwachstum und Proliferation (über c-fos, c-myc, c-jun) • Antinatriurese • Modulation der sympathischen NS Aktivität • ↓renaler Blutfluss • ↑myokardiale Kontraktilität • ↑PAI-1 • ↑Endothelin Freisetzung • ↑sympathische Aktivität 	<ul style="list-style-type: none"> • fetale Gewebeentwicklung • Vasodilatation (über ↑Bradykinin und NO) • Inflammation (über ↑NF-κB) • Wachstumsinhibition • Verbesserung der kardialen Funktion und Abnahme des chronotropen Effektes • vaskuläre Zelldifferenzierung • Apoptose (über ↓MAP- Kinasen) • Schutz von neuronalem Gewebe • ↑axonale Regeneration im ZNS

Sowohl über den AT₁-Rezeptor als auch über den AT₂-Rezeptor kann Ang II den Kernfaktor-kappa B (*nuclear factor-kappa B*, NF-κB) aktivieren (Esteban *et al.*, 2004). Dieser Transkriptionsfaktor konnte auch in Neuronen, Gliazellen und neuronalen Stammzellen detektiert werden.

NF-κB. NF-κB liegt als inaktive Form im Zytoplasma, bestehend aus drei Proteinuntereinheiten: einem Transkriptionsfaktor-Dimer (p65/p50 Heterodimere) und der inhibitorischen Untereinheit I-κB vor. Verschiedene NF-κB-DNA-bindenden Untereinheiten, wie p65 (Rel-A), Rel-B, c-Rel, p50 (gebildet aus einem 105 kDa Vorläufer) und p52 (gebildet aus einem 100 kD Vorläufer), sind identifiziert worden.

Die inhibitorische Untereinheit setzt sich u. a. aus I- κ B α , I- κ B β and Bcl-3 zusammen (Malek *et al.*, 2007; Mattson und Meffert, 2006; Memet, 2006; Kaltschmidt, 2005).

Im NS ist NF- κ B u. a. an Prozessen der Neuroprotektion und der Neurodegeneration beteiligt (Widera *et al.*, 2006b; Kaltschmidt *et al.*, 2005) und auch in Prozesse der Proliferation, Migration und Differenzierung neuronaler Stammzellen involviert (Memet, 2006; Widera *et al.*, 2006; Mattson, 2005). Verschiedene Studien zeigen, dass zwei NF- κ B-Komplexe, p65/p50 und p50/p50 in humanen Schwann-Zellen aktiviert und reguliert werden können (Laura *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2005). Nickols *et al.* (2003) beobachteten, dass die Aktivierung von NF- κ B für die periphere Myelinbildung in Schwann-Zellen erforderlich ist. Zudem ist NF- κ B in Schwann-Zellen an deren Differenzierung beteiligt (Mattson, 2003; Nickols *et al.*, 2003) und auch in die Regulation der Zytokin-Produktion involviert (Mattson und Meffert, 2006).

1.5 Zielsetzung

In vivo und *in vitro* Untersuchungen im Sehsystem der Ratte haben gezeigt, dass das Peptidhormon Ang II neuroregenerative Eigenschaften im ZNS besitzt (Lucius *et al.*, 1998). Jedoch gibt es bislang keine umfassenden Untersuchungen dazu, welche möglichen biologischen Funktionen Ang II im PNS, die mit axonaler Regeneration in Zusammenhang stehen könnten, und dabei speziell in den Schwann-Zellen erfüllt.

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob Ang II die Expression der Ang II-Rezeptoren, die NF- κ B-Aktivierung, die Zell-Proliferation, die Expression und Sekretion des neurotrophen Faktors NGF, die Freisetzung von NO und die Induktion von Apoptose in Schwann-Zellen beeinflussen kann. Weiterhin sollte ein möglicher Einfluss von Ang II auf oxidativ gestresste Schwann-Zellen untersucht werden. Diese Untersuchungen sollten an Schwannoma-Zellen erfolgen und, wenn möglich auch an primären Schwann-Zellen durchgeführt werden.

Um die Untersuchungen an primären Schwann-Zellen durchführen zu können, sollte eine Methode zur Präparation und Kultivierung primärer Ratten-Schwann-Zellen etabliert werden.

Anschließend sollte der Einfluss von Ang II *in vivo* auf mögliche neuroregenerative Prozesse am gequetschten *N. ischiadicus* der Ratte untersucht werden. Dafür sollten Präparate der *Nn. ischiadici* aus Ratten, die nach einer operativen Nerven-Läsion kontinuierlich für 20 Tage physiologische Kochsalzlösung, Ang II oder Ang II in Kombination mit Losartan bzw. in Kombination mit PD123319 direkt an den Ort der Nervenverletzung appliziert bekamen, histologisch untersucht werden. Zur Beurteilung möglicher in Gang gesetzter neuroregenerativer Prozesse, sollte die Expression von GAP-43 im distalen Nervensegment als Indiz für axonale Regenerationsprozesse und der Remyelinisierungsgrad der verletzten Nervenfasern in allen Gruppen miteinander verglichen werden

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) im Reinheitsgrad pro analysis bezogen. Die Bezugsquellen der übrigen Substanzen, Medien, Antikörper, Kits und Enzyme sind im nachfolgenden Text angegeben.

2.2 Kultivierung permanenter Zelllinien

Als permanente Zelllinie wurde die murine Tumorzelllinie TR6Bc1 (European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, UK) in Kultur genommen. Das Ursprungsgewebe dieser Zelllinie ist ein Schwannom, weshalb die Zellen im nachfolgenden Text als Schwannoma-Zellen bezeichnet werden.

Das Schwannoma-Medium enthielt folgende Substanzen: DMEM High Glucose (4,5 g / l) mit L-Glutamin (PAA, Pasching), versetzt mit 10 % (v / v) hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FKS), (Invitrogen)), 1 % (v / v) Penicillin / Streptomycin (PAA) und 1,2 g / l Tryptosephosphat.

Die Arbeiten mit den Zellen erfolgten unter einer Sterilwerkbank (Heraeus HS 12, Hanau).

Zellaussaat. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden zügig bei einer Temperatur von 37 °C im Wasserbad (Köttermann, Uetze-Hänigsen) aufgetaut und langsam in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) mit 10 ml Medium pipettiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 700 × g zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg), um das im Einfriermedium enthaltene zelltoxische Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 15 ml Medium resuspendiert und in eine 25 cm² Zellkulturflasche mit Filterdeckel (Sarstedt) ausgesät. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator (Heracell, Heraeus, Hanau) in wasserdampfgesättigter 5 % -iger CO₂-Atmosphäre bei 37 °C.

Passage. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70 - 80 % der Substratfläche wurden die Zellen subkultiviert. Dafür wurden die adhärent wachsenden Zellen abgelöst und mit einer Zellzahl von 3×10^5 Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen mit Filterdeckel in frisches Medium ausgesät.

Zellablösung. Für die Ablösung der Zellen wurde zunächst das Medium aus der Zellkulturflasche entfernt und die Zellen zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (Dulbecco's PBS, *phosphate buffer saline*, Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen. Dann erfolgte eine Inkubation für 30 Sekunden bei Raumtemperatur mit 5 ml der Dissoziationslösung (0,12 mg / ml Trypsin und 1,2 mg / ml EDTA in Dulbecco's PBS), welche anschließend abgesaugt wurde. Während einer nachfolgenden 3-minütigen Inkubation der Zellen bei 37 °C im Inkubator lösten sich die Zellen und konnten mit Medium vom Boden der Zellkulturflasche abgespült werden. Gleichzeitig wurde durch das im Medium enthaltene Serum die Trypsin-Aktivität inhibiert. Nach anschließender Zentrifugation der Zellsuspension (700 × g, 5 Minuten, Centrifuge 5804 R, Eppendorf) und Resuspension des Zellpellets in Medium, wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Ludwigshafen) nach Vorschrift gezählt und in neue Zellkulturflaschen eingesät, gelagert oder den anschließenden Versuchen entsprechend eingesetzt.

Lagerung der Zellen. Für die Lagerung wurden die Zellen mit einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen / ml in Medium mit zusätzlich 10 % (v / v) DMSO aufgenommen, aliquotiert und bei -70 °C für 24 Stunden eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff zur Dauerlagerung überführt.

2.3 Isolierung und Kultur primärer Zellen

Die Zellen wurden aus Geweben von Wistar-Ratten (Tierhaus des Physiologischen Instituts, Universität Kiel) isoliert. Zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme waren die Tiere 2 Tage alt (postnataler Tag 2, P₂-Ratten) und wurden bis dahin unter Standardbedingungen (12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus) gehalten. Kurz vor der Gewebeentnahme erfolgte die Tötung der Tiere durch Dekapitierung. Das Gewebe wurde unter semisterilen Laborbedingungen auf Eis präpariert. Die Zellisolierung erfolgte unter der Sterilwerkbank mit dem Ziel, reine Primärkulturen zu gewinnen.

2.3.1 Isolierung und Kultur von Schwann-Zellen aus den *Nn. ischiadici*

Zur Präparation der *Nn. ischiadici* aus den dorsalen Oberschenkeln der P₂-Ratten wurde zunächst die Haut vom Os sacrum bis zum Kniegelenk mit einem Einmalskalpell (Cutfix[®], Braun, Tuttlingen) geöffnet. Anschließend erfolgte die Durchtrennung der dorsalen Oberschenkelmuskulatur, um die *Nn. ischiadici* darzustellen. Die Nerven wurde zum Einen im Bereich des Os sacrum und zum Anderen im Bereich der Aufteilungsstelle in den *N. tibialis* und *N. fibularis* durchtrennt und mit einer Länge von ca. 5 mm entnommen. Es wurden jeweils beide Nerven von insgesamt 12 - 14 Versuchstieren präpariert und in ein 60 × 15 mm Gewebekulturschälchen (Sarstedt) mit kaltem Dulbecco's PBS, versetzt mit 1 % (v / v) Penicillin / Streptomycin, überführt.

Die Zellisolierung aus den *Nn. ischiadici* erfolgte direkt im Anschluss. Dafür wurden die Nerven zweimal mit Dulbecco's PBS gewaschen, mittels Einmalskalpell und unter Zuhilfenahme einer Pinzette in ca. 1 mm große Stücke segmentiert und anschließend dissoziiert. Die Dissoziation erfolgte durch Inkubationen mit zwei verschiedenen Dissoziationslösungen und durch mechanische Vereinzelung der Zellen. Dafür wurden die Nervensegmente zuerst in ein steriles Gewebekulturschälchen umgesetzt und für 10 Minuten mit 10 ml der ersten Dissoziationslösung (0,1 % (w / v) Trypsin und 0,1 % (w / v) Kollagenase in Dulbecco's PBS) bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung entfernt und die Nervensegmente mit 10 ml der zweiten Dissoziationslösung (0,5 % (v / v) Trypsin in Dulbecco's PBS) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Stoppen der Enzymaktivität von Trypsin durch Zugabe von 10 % (v / v) FKS in Medium (DMEM High Glucose (4,5 g / l) mit L-Glutamin) wurden die Nervensegmente zusammen mit der Dissoziationslösung in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 700 × g (Centrifuge 5804 R, Eppendorf) zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet unter Zugabe von 50 µg / ml DNase (Roche, Mannheim) in 1 ml Schwann-Zell-Medium resuspendiert. Das Schwann-Zell-Medium hatte folgende Zusammensetzung: Melanocyte Growth Medium C-24010B (Promocell, Heidelberg), versetzt mit 2,524 g / l Natriumhydrogen-carbonat (NaHCO₃), 5 µg / ml *Bovine Pituitary Extract* (Rinderhypophysenextrakt) und Supplement-Mix C-39415 (Promocell).

Die Vereinzelnung der Zellen erfolgte durch mehrfaches Resuspendieren der Zellsuspension mittels einer Pasteurpipette (Eydam, Kronshagen), deren Öffnung durch Einschmelzung über einer Gasflamme (Fireboy S1000, Techomare AG, Wallisellen) verengt wurde und durch eine nachfolgende Filtration der Zellsuspension durch ein 24 µm-Zellfilter.

Poly-D-Lysin (PDL)-Beschichtung von Zellkulturflaschen und Deckgläsern. Die Böden der 25 cm² Zellkulturflaschen bzw. die Deckgläser (24 × 24 mm, Omnilab; Bremen) wurden für die Aussaat von Primärkulturen mit PDL beschichtet. Die positiven Ladungen des basischen Polymers erleichterten den Zellen, mit ihren negativ geladenen Zellmembranen, das Anheften.

Für die PDL-Beschichtung wurden die Zellkulturflaschen für 2 Stunden mit 3 ml und die Deckgläser für 2 Stunden mit 200 µl einer 0,002 %-igen (w / v) PDL-Lösung in A. bidest bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Flaschen bzw. Deckgläser viermal mit A. bidest gespült. Die Flaschen wurden bis zum Gebrauch mit 3 ml serumfreien Medium (DMEM High Glucose (4,5 g / l) mit L-Glutamin) im Inkubator gelagert, während die Deckgläser unter der Sterilwerkbank bei Raumtemperatur getrocknet wurden.

Kultivierung. Die Einzelzellen wurden in PDL-beschichtete 25 cm² Zellkulturflaschen mit Filterdeckel in 8 ml Schwann-Zell-Medium, supplementiert mit 2 µM Forskolin (Biomol, Hamburg), ausgesät und im Inkubator in wasserdampfgesättigter 5 %iger CO₂ - Atmosphäre bei 37 °C kultiviert.

Ein Mediumwechsel erfolgte jeweils im Abstand von 2 Tagen. Nach ca. 7 Tagen erreichten die Zellen eine Konfluenz von 80 – 90 % der Substratfläche, konnten phänotypisiert und für Versuche eingesetzt werden. Dafür wurden die Zellen zunächst abgelöst.

Zellablösung. Die primären Schwann-Zellen wurden nach dem für Schwannoma-Zellen beschriebenen Verfahren vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst (Kap. 2.2). Das serumhaltige Medium zum Stoppen der Trypsin-Aktivität wurde nach Zentrifugation der Zellsuspension (700 × g, 5 Minuten, Centrifuge 5804 R, Eppendorf) entfernt und die primären Schwann-Zellen in serumfreiem Schwann-Zell-Medium (Kap. 2.3.1) resuspendiert.

2.3.2 Isolierung und Kultur von Schwann-Zellen aus Spinalganglien

Ganglien sind Nervenzellanhäufungen, welche in den Verlauf von peripheren Nerven eingeschaltet sind. Die Spinalganglien, auch als Hinterwurzelganglien bezeichnet, liegen in der dorsalen Wurzel eines Spinalnerven, außerhalb des Rückenmarks. Sie gehören somit zum PNS. In den Spinalganglien befinden sich die Somata der afferenten Neurone, welche von Satellitenzellen umgeben sind. Ihre Nervenfasern treten durch die Hinterwurzel in das Rückenmark ein und werden von Schwann-Zellen umhüllt. Die Satellitenzellen werden ebenfalls zu den Schwann-Zellen gezählt.

Isolierung. Vor der Spinalganglien-Präparation lagerten die Tiere nach der Dekapitierung für 2 Stunden auf Eis. Danach wurde vom Hals bis zum Becken entlang der Wirbelsäule ein Hautschnitt gesetzt, um die darunter liegende Muskulatur freizulegen. Anschließend wurde mit einer Präparierschere die Muskulatur von der Wirbelsäule durch zwei paravertebrale Längsschnitte gelöst und die Wirbelsäule in Höhe des ersten Brustwirbels durchtrennt. Die Freilegung des Wirbelkanals erfolgte mit Hilfe einer in den Wirbelkanal eingeführten Präparierschere durch fortlaufende Durchtrennung der seitlichen Wirbelbögen vom ersten Brustwirbel bis zum Kreuzbein. Nach vorsichtiger Entfernung des Rückenmarkes wurden die Spinalganglien sichtbar und konnten mittels einer feinen Pinzette aus den *Foramina intervertebralia* entnommen und sofort in ein 60 × 15 mm Gewebekulturschälchen, das kaltes Dulbecco's PBS, versetzt mit 1 % (v / v) Penicillin / Streptomycin enthielt, überführt werden. Die Zellisolierung aus den Spinalganglien erfolgte direkt im Anschluss. Dafür wurden die Spinalganglien zweimal mit Dulbecco's PBS gewaschen und anschließend dissoziiert. Für die Dissoziation wurden die Spinalganglien in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 45 Minuten bei 37°C im Wasserbad (Köttermann) in einer Dissoziationslösung (24 mg HEPES; 25 mg Trypsin und 3 mg Kollagenase in 10 ml DMEM) unter Zusatz von 5 µg / ml DNase inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Enzymaktivität von Trypsin durch Zugabe von 10 ml 10 % (v / v) FKS in Medium (DMEM High Glucose (4,5 g / l) mit L-Glutamin) gestoppt und aus den dissoziierten Spinalganglien Einzelzellen isoliert. Dabei wurde analog der Isolierung von Einzelzellen aus den *Nn. ischiadici* (Kap. 2.3.1) verfahren.

Zur Veranschaulichung der beiden Präparationstechniken für Schwann-Zellen wurden die wichtigsten Präparationsschritte fotografiert (Digitalkamera Canon C 330) und in Abb. 2.1 zusammengefasst.

Kultivierung. Die Kultivierung der Schwann-Zellen aus Spinalganglien erfolgte wie in Kap. 2.3.1 beschrieben. Die Neurone, die nicht durch die Filtration eliminiert werden konnten, überlebten im Schwann-Zell-Medium nur noch 1 bis 2 Tage.

Zellablösung. Die primären Schwann-Zellen aus Spinalganglien wurden nach dem für primäre Schwann-Zellen aus *N. ischiadici* beschriebenen Verfahren vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und in Schwann-Zell-Medium resuspendiert (Kap. 2.3.1).

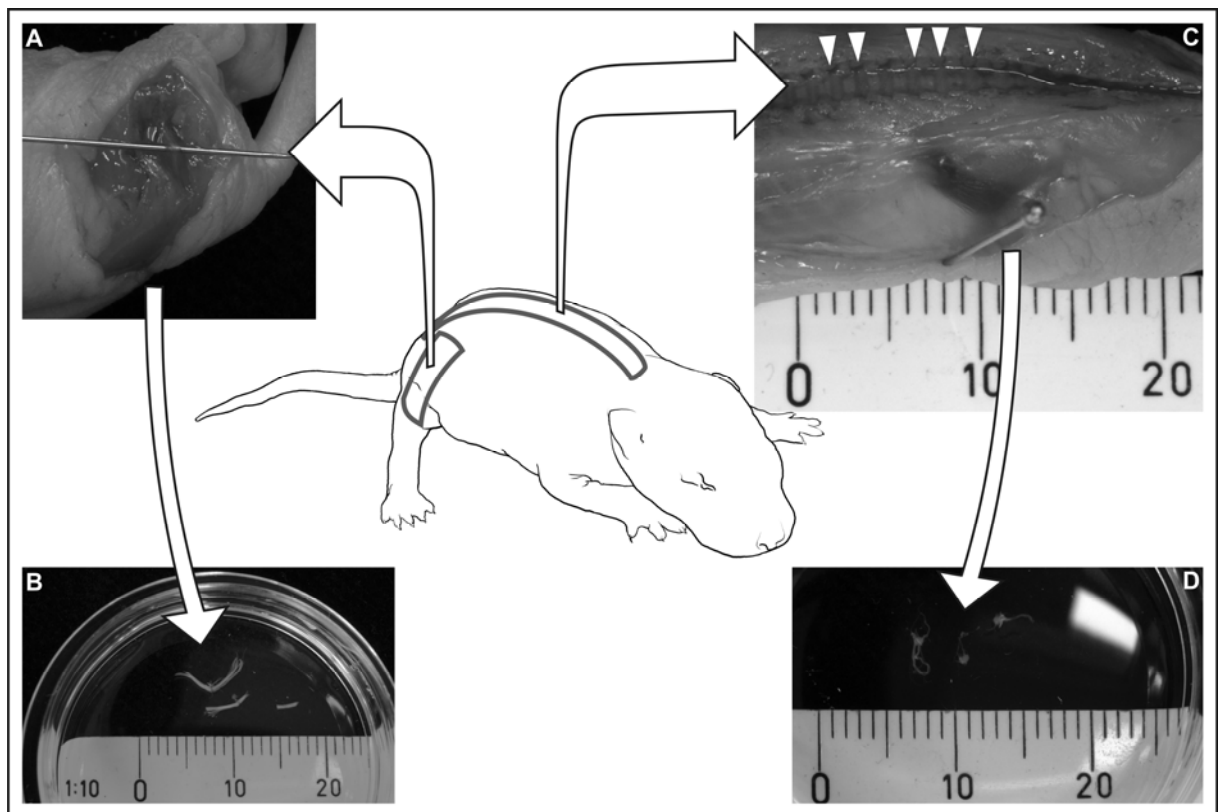


Abb. 2.1: Präparation der *Nn. ischiadici* und der Spinalganglien zur Schwann-Zell-Isolierung. Die Schwann-Zellen wurden aus den *Nn. ischiadici* (**A und B**) oder aus Spinalganglien (**C und D**) von früh postnatalen Ratten (P_2) isoliert. Die Gewebeentnahme erfolgte in den gekennzeichneten Bereichen. **A:** Vom dorsalen Oberschenkel wurde die Haut vom Os sacrum bis zum Kniegelenk entfernt und die dorsale Oberschenkelmuskulatur durchtrennt, um den *N. ischiadicus* darzustellen. Zur Kennzeichnung des Nerven befindet sich in dieser Abb. eine Präparationsnadel unter diesem. **B:** Der Nerv wurde im Bereich des Os sacrum und im Bereich der Aufteilungsstelle in den *N. tibialis* und den *N. fibularis* durchtrennt und in ein PBS-gefülltes Gewebekulturschälchen überführt. Es wurden beide Nerven von ca. 12 Tieren entnommen. **C:** Vom Hals bis zum Becken wurde ein Hautschnitt entlang der Wirbelsäule gesetzt und die Muskulatur von der Wirbelsäule durch zwei paravertebrale Längsschnitte gelöst. Durch fortlaufende Durchtrennung der seitlichen Wirbelbögen erfolgte die Freilegung des Wirbelkanals, aus dem das Rückenmark entfernt wurde. Die Pfeile zeigen auf die Spinalganglien. **D:** Die Spinalganglien von ca. 10 Tieren wurden mittels einer feinen Pinzette aus den *Foramina intervertebralia* entnommen und in ein PBS-gefülltes Gewebekulturschälchen überführt.

2.3.3 Isolierung und Kultur von Fibroblasten aus Spinalganglien

Die Präparation der Spinalganglien und die Isolierung von Einzelzellen daraus wurde wie in Kap. 2.3.2 beschrieben durchgeführt. Die isolierten Zellen wurden anschließend in 25 cm² Zellkulturflaschen mit Filterdeckel in 8 ml Fibroblastenmedium (DMEM High Glucose (4,5 g / l) mit L-Glutamin, supplementiert mit 10 % (v / v) FKS und 1 % (v / v) Penicillin / Streptomycin) ausgesät und im Inkubator in wasserdampfgesättigter 5 %iger CO₂-Atmosphäre bei 37°C gehalten. Ein Wechsel des Mediums erfolgte im 2-tägigen Abstand. Nach 7 Tagen wurden die Zellen das erste Mal subkultiviert. Dafür wurden die adhärent wachsenden Zellen wie beschrieben (Kap. 2.2) abgelöst und in neue 75 cm² Zellkulturflaschen mit Filterdeckel in Fibroblastenmedium ausgesät. Weitere Subkultivierungen erfolgten bei Erreichen einer kritischen Konfluenz von 90 – 100 % der Substratfläche. Nach der dritten Passage konnten die Kulturen aus Spinalganglien-Fibroblasten phänotypisiert und für Versuche eingesetzt werden.

2.4 Misch- und Co-Kultivierung von Zellen

Für Phänotypisierungsexperimente sowie zur Analyse der gegenseitigen Beeinflussung von Schwann-Zellen und Fibroblasten wurden zum Einen Spinalganglien-Mischkulturen (Schwann-Zellen und Fibroblasten aus der Ratte) und zum Anderen Co-Kulturen aus Schwannoma-Zellen (Maus) und Spinalganglien-Fibroblasten (Ratte) angelegt.

Spinalganglien-Mischkultur. Für das Anlegen einer Spinalganglien-Mischkultur wurden Einzelzellen aus Spinalganglien isoliert (Kap. 2.3.2), in 25 cm² Zellkulturflaschen mit Filterdeckel in 8 ml Fibroblastenmedium (Kap. 2.3.3) ausgesät und im Inkubator in wasserdampfgesättigter 5 %iger CO₂-Atmosphäre bei 37°C gehalten. Ein Wechsel des Mediums erfolgte im 2-tägigen Abstand. Nach ca. 7 Tagen erreichten die Zellen eine Konfluenz von 80 – 90 % der Substratfläche. Sie wurden abgelöst (Kap. 2.2), in Fibroblastenmedium resuspendiert und für Versuche als 'Mischkultur' eingesetzt.

Co-Kultur. Zuerst wurden Spinalganglien-Fibroblasten mit einer definierten Zellzahl entweder in 25 cm² Zellkulturflaschen oder in 6-Loch Zellkulturplatten bzw. in 24-Loch Zellkulturplatten (Sarstedt) ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in Fibroblastenmedium (Kap. 2.3.3) im Inkubator. Nach 72 Stunden wurde das Medium

abgesaugt und auf den Fibroblasten-Monolayer wurde eine definierte Zellzahl von Schwannoma-Zellen ausgesät. Diese Co-Kultur wuchs für 24 Stunden in Schwannoma-Medium (Kap 2.2) im Inkubator, bevor sie für Versuche eingesetzt wurde.

2.5 Fotografieren von Zellkulturen

Um Fotografien der Zellkulturen anzufertigen, wurden diese unter dem Phasenkontrastmikroskop Axiovert 35 M (Zeiss) betrachtet und fotografiert (Contax, Zeiss).

2.6 Phänotypisierung der primären Zellkulturen

Die Phänotypisierung der Primärkulturen wurde durchgeführt, um den Reinheitsgrad der jeweiligen Zellkultur bzw. Subkultur zu ermitteln. Als Methoden wurden die Immunzytochemie oder die Durchflusszytometrie (FACS) eingesetzt. Diese Methoden werden im nachfolgenden Text beschrieben.

2.6.1 Phänotypisierung mittels Immunzytochemie

Die Immunzytochemie ist eine Methode, mit der sich von der Zelle exprimierte Proteine mit Hilfe von Farbstoff-gekoppelten Antikörpern anfärben lassen.

Zur Durchführung dieser Methode wurden die Zellen auf fettfreie, sterile PDL-beschichtete Deckgläser ausgesät (Kap. 2.3.1), welche sich in 6-Loch Gewebekulturplatten mit Deckel (Sarstedt) befanden. Dort wuchsen sie in dem für die jeweilige Zellart vorgesehenen Medium für 24 Stunden im Inkubator, bevor sie für die weiteren Untersuchungen auf den Deckgläsern fixiert wurden.

Fixierung von Zellen auf Deckgläsern. Für die Fixierung verblieben die auf den Deckgläsern gewachsenen Zellen in den 6-Loch Gewebekulturplatten. Vor der Zellfixierung wurde das Medium entfernt und die Zellen dreimal mit Dulbecco's PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen entweder mit 1 ml eiskaltem Aceton für 10 Minuten im Kühlschrank oder für 40 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Zamboni-Fixierlösung auf den Deckgläsern fixiert. Die Zamboni-Fixierlösung wurde folgendermaßen hergestellt: 80 g Paraformaldehyd wurden bei 60 °C in 350 ml gesättigter Pikrinsäure unter tropfenweiser Zugabe von Natriumhydroxid (NaOH)

gelöst. Dieses Gemisch wurde anschließend in eine 2 l Flasche filtriert und mit Phosphatpuffer (6,62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und 44,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, gelöst in 2 l A. bidest) auf 2 l Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach der Entfernung des Fixiermittels wurden die Zellen dreimal mit Dulbecco's PBS und einmal mit A. dest gespült, bevor sie entsprechend der Fragestellung gefärbt wurden.

2.6.1.1 Immunzytochemische Färbung von Zellproteinen

Nach der Fixierung wurden die Zellen mit spezifischen monoklonalen Primärantikörpern gegen die Zell-typischen Oberflächenmarkerproteine für 45 – 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als primärer Antikörper für die Markierung der Schwann-Zellen wurde anti p75^{LNGFR} MAB 365 (1,07 mg / ml, Chemicon, Hofheim) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet, und zur Markierung der Fibroblasten wurde anti Thy-1 CBL 1500 (0,5 mg / ml, Cymbus Biotechnology, UK) in einer Verdünnung von 1:300 eingesetzt. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 0,75 % (w / v) Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine*, BSA) in Dulbecco's PBS. Primärantikörper, die nicht an das gesuchte Epitop gebunden hatten, wurden nach der Inkubationszeit dreimal mit Dulbecco's PBS ausgewaschen. Die anschließende Detektion gebundener Primärantikörper wurde je nach Fragestellung Enzym-Substrat-spezifisch mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und dem Chromogen Diaminobenzidin (DAB) (Kap. 2.6.1.1.1) oder mit der indirekten Immunfluoreszenz (Kap. 2.6.1.1.2) durchgeführt.

2.6.1.1.1 Enzym-Substrat-spezifische Detektion der gebundenen Primärantikörper

Die Enzym-Substrat-spezifische Detektion der gebundenen Primärantikörper wurde nach Herstellerangaben mit Substanzen aus zwei gebrauchsfertigen Sets durchgeführt. Der biotinylierte Sekundärantikörper (anti Maus-IgG), der an die tierspezifische Immunglobulinkette des jeweiligen Primärantikörpers bindet und die anschließend zugegebene Avidin-gebundene Meerrettich-Peroxidase wurden aus einem 'Vectastain Elite ABC-Peroxidase-Kit' (Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen) entnommen. Avidin bindet mit großer Affinität an Biotin und markiert so gebundene biotinylierte Sekundärantikörper. Als Chromogen wurde DAB aus einem DAB-Substrat-Kit (Vector Peroxidase Substrate Kit DAB SK 4100, Linaris) eingesetzt. Um die Zellkerne der DAB-gefärbter Zellen zu färben, wurden diese mit einer sauren Hämalaunlösung nach Mayer (1:1 in A. dest) für 3 Minuten gegen

gefärbt. Diese Lösung wurde folgendermaßen hergestellt: Zunächst wurden 1 g Hämatoxilin, 0,2 g Natriumjodatin und 50 g Kalialaun in 1 l A. dest gelöst. Zu dieser Lösung wurden 50 g Chloralhydrat und 1 g kristalline Zitronensäure gegeben. Nach Filtration der Lösung wurden diese mit 1 % (v / v) wässrigem Eosin G versetzt und zum Gebrauch 1:1 in A. dest verdünnt.

Nach der Färbung wurden die Zellen eingedeckt.

Eindecken. Die Deckgläser mit den gefärbten Zellen wurden mit der 'Zell-Seite' auf Aquatex[®], was zuvor auf Objektträger (26 x 26 mm, Roth, Karlsruhe) aufgetropft wurde, mittels einer Pinzette luftblasenfrei aufgelegt. Nach einer Trockenzeit von ca. 45 Minuten konnten die gefärbten Zellen mikroskopiert werden.

Mikroskopie. Die gefärbten Zellen wurden unter einem Mikroskop (Axiophot, Zeiss, Jena) betrachtet und ausgezählt. Die Auszählung der positiv gefärbten (braun-violetten) Zellen erfolgte im mittleren Teil der Deckgläser mit einem 40-er Objektiv. Durch Auszählung der Zellkerne wurde die Gesamtzellzahl ermittelt. Es wurden pro Versuch drei verschiedene Ansätze gefärbt und in verschiedenen Sichtfeldern ausgezählt. Die Zellen konnten mit einer angeschlossenen Digitalkamera (Axio-Cam) fotografiert werden.

Eine Zellkultur wurde als reine Kultur für weitere Versuche verwendet, wenn sie zu mindestens 80 % aus Schwann-Zellen bestand.

2.6.1.1.2 Detektion der gebundenen Primärantikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz

Um gebundene Primärantikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz zu detektieren, wurden die Zellen mit einem Sekundärantikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carbocyanin 3 (Cy 3) gekoppelt war (anti Maus-IgG C2181-Cy, 1 mg / ml, Sigma-Aldrich) in einer Verdünnung von 1:200 für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit Dulbecco's PBS entfernt. Zur Zellkernfärbung wurden die Zellen für 3 Minuten mit dem DNA-interkallierenden Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid in einer Konzentration von 1:1 in Dulbecco's PBS gefärbt.

Eindecken. Das Eindecken erfolgte wie oben beschrieben (Kap. 2.6.1.1.1). Es wurde das Eindeckmedium Immo-Mount (Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, Pennsylvania) verwendet.

Mikroskopie. Die Betrachtung der Zellen erfolgte mit dem Mikroskop (Axiophot oder Axiovert, Zeiss, Jena). Dabei wurde der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 mit einem Laser der Wellenlänge 549 nm angeregt und fluoreszierte rot. Auf diese Weise konnten die rot fluoreszierenden Cy 3-markierten Oberflächenproteine auf den Zellen detektiert werden. Die positiv rot gefärbten Zellen wurden ausgezählt und in ein Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt (Kap. 2.6.1.1.1). Die Zellen konnten mit einer angeschlossenen Digitalkamera AxioCam, Zeiss) fotografiert werden. Die Fotos wurden anschließend mit dem Programm Axiovision (Zeiss) archiviert.

2.6.2 Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie

Zur Unterscheidung von Zellen aufgrund der Expression bestimmter Oberflächenmarker wurden diese mit an Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt und anschließend im Durchflusszytometer (FACSscan[®]; BD PharMingen, San Diego, USA) erfasst. Dieses Gerät ist in der Lage, Zellen in einer Zellsuspension zu zählen, sie nach ihrer Größe und Granularität zu trennen sowie die Intensität der Fluoreszenz gefärbter Zellen zu messen.

Für die Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie wurden je Probe 2×10^5 Zellen in FACS[®]-Röhrchen (BD PharMingen) überführt und zweimal mit 0,75 % (w / v) BSA in Dulbecco's PBS bei Raumtemperatur gewaschen (700 × g, 5 Minuten). Danach wurden die Zellen mit einem monoklonalen Primärantikörper gegen das gesuchte Protein für 45 – 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Primärantikörper wurden verwendet: anti p75^{LNGFR} MAB 365 (1:100) für die Markierung der Schwann-Zellen und anti Thy-1 CBL 1500 (1:300) für die Markierung der Fibroblasten (Kap. 2.6.1.1). Nach dreimaligem Auswaschen überschüssiger Primärantikörper mit Dulbecco's PBS (700 × g, 5 Minuten, Centrifuge 5804 R, Eppendorf) erfolgte eine 45-minütige Inkubation mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper: anti Maus-IgG C2181-Cy (1:100), (Kap. 2.6.1.1.2), der an die mausspezifische Domäne des monoklonalen Primärantikörpers bindet. Nichtgebundene Sekundärantikörper wurden anschließend dreimal mit Dulbecco's PBS (700 × g, 5 Minuten, Centrifuge 5804 R, Eppendorf) ausgewaschen und die Zellpellets in 250 µl Dulbecco's PBS resuspendiert. Die nachfolgende Detektion gefärbter Zellen erfolgte im Durchflusszytometer mit dem Programm 'Cellquest'. Anschließend wurden die Ergebnisse mit dem Programm 'WinMDI' grafisch dargestellt.

2.7 Untersuchungen zu den Ang II-Rezeptoren

Das Vorhandensein der Ang II-Rezeptoren wurde in den Zellen zum Einen auf mRNA-Ebene mittels einer semiquantitativen Reversen Transkriptase (RT)-Polymerase Kettenreaktion (PCR) (Kap. 2.11) und zum Anderen auf Protein-Ebene mit einer immunzytochemischen Färbung der Rezeptorproteine (Kap. 2.6.1.1) untersucht. Eine mögliche Regulation der Ang II-Rezeptoren durch verschiedene Stimulantien wurde mittels einer *realtime*-RT-PCR (Kap. 2.12) und mittels Western-Blot (Kap. 2.14) untersucht.

Untersuchung mittels RT-PCR. In der RT-PCR wurden für die Untersuchung der Schwannoma-Zellen die Primer: Maus AT_{1a}-Rezeptor, Maus AT₂-Rezeptor und Maus GAPDH (Tab. 2.1) eingesetzt. Für die Untersuchung der primären Schwann-Zellen und Spinalganglien-Fibroblasten wurden die Primer: Ratte AT_{1a}-Rezeptor, Ratte AT₂-Rezeptor und Ratte-GAPDH verwendet (Tab. 2.1). Die Versuchsdurchführung wird in Kap. 2.11 beschrieben.

Untersuchung mittels Immunzytochemie. Die immunzytochemische Färbung (Kap. 2.6.1.1) der Ang II-Rezeptorproteine erfolgte an Zamboni-fixierten Zellen (Kap. 2.6.1) mit der indirekten Immunfluoreszenz (Kap. 2.6.1.1.2) wie oben beschrieben. Als Primärantikörper wurden verwendet: anti AT₁-Rezeptor AT₁(N-10) und anti AT₂-Rezeptor AT₂(H-143) (200 µg / ml, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:100.

Untersuchung mittels *realtime*-RT-PCR. Eine mögliche Regulation der Ang II-Rezeptoren wurde mittels *realtime*-RT-PCR mit dem TaqMan®-System (Kap. 2.12.1) unter Verwendung folgender TaqMan® Gene Expression Assays: RnAgtr1a, RnAgtr2, 18S rRNA und RnGapdH (Tab. 2.2) untersucht. Die Versuchsdurchführung wird in Kap. 2.12 beschrieben.

Untersuchung mittels Western-Blot. Eine mögliche Regulation der Ang II-Rezeptoren wurde mittels Western-Blot untersucht. Die Immunfärbung der Rezeptorproteine (Kap. 2.14.3) erfolgte mit den oben genannten Antikörpern (Kap. 2.7): anti AT₁-Rezeptor AT₁(N-10) und anti AT₂-Rezeptor AT₂(H-143) in einer Verdünnung von 1:100. Die Versuchsdurchführung wird in Kap. 2.14 beschrieben.

2.8 Stimulation von Zellen

Für die nachfolgend beschriebenen Methoden 2.9 bis 2.21 wurden entweder stimulierte oder unstimulierte Zellen eingesetzt. Als Stimulanzien wurden dabei verwendet: Ang II (Bachem, Bubendorf, Schweiz), Losartan (ein Geschenk von Dr. R. Smith, DuPont Merck Pharmaceutical Company, Wilmington, Delaware, USA), PD123319 (ein Geschenk von Dr. D. Taylor, Parke Davis Pharmaceutical Research, Ann Arbor, Michigan, USA), H₂O₂, TNF- α (ImmunoTools, Friesoythe) oder IFN- γ (ImmunoTools, Friesoythe).

Die jeweils eingesetzten Konzentrationen und die Stimulationsdauer richteten sich nach dem Hintergrund des Versuches und sind im Ergebnisteil dieser Arbeit zu jedem Ergebnis angegeben.

2.9 Isolierung von RNA aus Monolayer-Kulturen

Als Ausgangsmaterial für eine *reverse* Transkription (Kap. 2.10) mit anschließender Polymerase Kettenreaktion (PCR) (Kap. 2.11) wurde aus den Zellen die RNA isoliert. Vor der RNA-Isolierung wuchsen die Zellkulturen für mindestens 24 Stunden in 25 cm² Zellkulturflaschen mit Filterdeckel oder in 6-Loch Gewebekulturschälchen in dem für die jeweilige Zellart vorgesehenen Medium zu einem Monolayer.

Zellablösung. Nach Entfernung des Mediums und zweimaligem Spülen der Zellen mit Dulbecco's PBS wurden die Zellen mit 1 ml Trizol[®] Reagenz (Invitrogen) versetzt und mit einem Zellschaber (Cell Craper, 24 cm, TPP AG Trasadingen, Schweiz) abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden mittels einer Pipette homogenisiert und die RNA aus den Zellen isoliert.

RNA-Isolierung. Das Homogenat wurde in ein 1 ml Eppendorfgefäß pipettiert und bei einer Temperatur von 6 °C für 10 Minuten bei 12000 × g zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 5 Minuten bei 25 °C inkubiert und mit 200 µl Chloroform pro 1 ml Trizol[®]-Reagenz versetzt und 15 Sekunden per Hand geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation bei einer Temperatur von 6 °C für 15 Minuten bei 12000 × g (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) bildeten sich in dem Reaktionsgefäß drei Phasen, wobei die obere, wässrige Phase die RNA enthielt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert, mit 500 µl Isopropylalkohol gemischt und für 10 Minuten bei 25 °C (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurde das

Gemisch bei einer Temperatur von 6 °C für 10 Minuten bei 12000 × g (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) zentrifugiert. Von dem entstandenen RNA-Pellet wurde vorsichtig der Überstand entfernt und das Pellet mit 1 ml 75 % (v/v) Ethanol versetzt. Nach einer anschließenden Zentrifugation (5 Minuten, 7500 × g, 6 °C, Centrifuge 5415 R, Eppendorf) wurde der Ethanol-Überstand entfernt, das RNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und die RNA in 50 µl RNase-freiem A. bidest gelöst. Im Anschluss an eine 10-minütige Inkubation bei 60 °C wurde die RNA-Menge photometrisch bestimmt und die RNA bei -70 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Quantifizierung der RNA. Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurden mittels eines Spektrophotometers (U-2000 Spectrophotometer, Hitachi) bestimmt. Dafür wurden für jede Probe in eine Küvette 995 µl Messpuffer (2 mM Na₂HPO₄, pH 8,5) vorgelegt, zu dem dann je 5 µl der zu quantifizierenden RNA pipettiert wurden. Aus der Absorption, gemessen bei 260 nm, ergab sich die Menge an RNA. Dabei wurde davon ausgegangen, dass 40 µg / ml RNA einer optischen Dichte (OD) von 1 entspricht.

2.10 Reverse Transkription

Für den qualitativen Nachweis bestimmter mRNA-Transkripte mittels PCR wurde die isolierte RNA zunächst mit dem Enzym Reverse Transkriptase (RNA abhängige DNA-Polymerase) in eine komplementäre DNA (*complementary DNA*; cDNA) umgeschrieben, die als Ausgangsmaterial für die PCR dient. Um keine genomische DNA zu vermehren, wurde vorab ein DNA-Verdau mit 10000 *units* einer RNase-freien DNase (Promega) für 15 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte für 15 Minuten bei 65 °C in Gegenwart von 25 mM EDTA.

Für die nachfolgende *reverse* Transkription wurden 1 µg DNA-freie RNA mit 200 ng eines Random Hexamer Primer-Gemisches (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) in einem Volumen von 12 µl bei 70 °C denaturiert, auf 37 °C äquilibriert und anschließend 8 µl Transkriptionsmix zugefügt.

Transkriptions-Mix.	5 × Reaktionspuffer	4,0 µl
	10 mM dNTP-Mix	2,0 µl
	A. bidest	1,0 µl
	Reverse Transkriptase (200 U / µl)	1,0 µl

Es wurde die Reverse Transkriptase 'Revert Aid™ H Minus' (Fermentas) verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler (Gene Amp® PCR System 9700, Applied Biosystems).

Nach Primer-Anlagerung (15 Minuten, 25 °C) erfolgte die *reverse* Transkription bei 42 °C für 60 Minuten mit anschließender Enzyminaktivierung (10 Minuten, 70 °C). Die synthetisierte cDNA wurde bis zur Durchführung der PCR bei –20 °C aufbewahrt.

2.11 Semiquantitative RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR werden cDNA-Abschnitte spezifisch in mehreren Zyklen vermehrt, wobei sich in jedem Zyklus die Menge an cDNA verdoppelt. Jeder PCR-Zyklus besteht aus den drei Schritten: Denaturierung, Anlagerung und Extension, welche bis zu vierzigmal wiederholt werden können.

Für den qualitativen Nachweis der Expression bestimmter Rezeptorproteine in isolierter (Kap.2.9) und *revers* transkribierter (Kap. 2.10) RNA wurde eine RT-PCR durchgeführt. Gleichzeitig wurde in der PCR-Reaktion zum Nachweis des gesuchten spezifischen Genprodukts ein Abschnitt des '*Housekeeping Gens*' Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) amplifiziert. Dieses Gen wird konstitutiv in jeder Zelle exprimiert und diente hier als Referenzgen.

Reaktionsansatz für die RT-PCR.	10 × Reaktionspuffer (Eppendorf)	5,0 µl
	dNTP-Mix	2,0 µl
	<i>Primer</i> (vorwärts)	2,5 µl
	<i>Primer</i> (rückwärts)	2,5 µl
	Hotmaster®Taq-Polymerase (Eppendorf)	0,3 µl
	RNase-freies A. bidest	33,7 µl
	cDNA	4,0 µl

Das Endvolumen im Reaktionsgefäß betrug je Ansatz 50 µl.

Nach einer initialen Aktivierung der PCR für 5 Minuten bei 94 °C erfolgte die Denaturierung für 30 Sekunden bei 94 °C, bei der die doppelsträngige cDNA aufgeschmolzen wurde. An die entstandenen komplementären Einzelstränge lagerten sich bei herabgesetzter, variabler Anlagerungstemperatur innerhalb von 45 Sekunden die Primer an (*Annealing*) und fungierten als Starter für die Polymerisation. Eine Übersicht über die verwendeten Sequenzierprimer (MWG-Biotech AG; Ebersberg) und deren speziellen Anlagerungstemperaturen ist in Tabelle 2.1 gegeben. Während der nachfolgenden Extension für 1 Minute bei 72 °C wurde, ausgehend von den angelagerten Primern, die zu den Einzelsträngen komplementären Sequenzen synthetisiert. Es wurden insgesamt 35 PCR-Zyklen in der PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Im Anschluss an diese erfolgte eine finale Extension für 7 Minuten bei 72 °C, um die Menge an PCR-Produkt zu erhöhen.

PCR-Programm.	Initiale Aktivierung	94 °C	5 min	} 35 Zyklen
	Denaturierung	94 °C	30 sec	
	<i>Annealing</i>	variabel	45 sec	
	Extension	72 °C	1 min	
	Finale Extension	72 °C	7 min	

Primer. Die Sequenzen der Primer wurden entweder aus der Literatur entnommen oder mit dem Programm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) erstellt (Tab. 2.1). Die Primer-Lyophilisate (MWG-Biotech AG, Ebersberg) wurden in A. bidest in einer Konzentration von 100 pmol / µl (w / v) gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der Arbeitsverdünnung betrug 10 pmol / µl (w / v) und wurde kurz vor Gebrauch hergestellt.

Tabelle 2.1: In der semiquantitativen RT-PCR verwendete Primer.

Spezifisches Gen	Primer	Sequenzen (5'→3')	Annealing-temperatur [°C]	Produkt
Ratte GAP-DH	rGAPDH v rGAPDH r	AATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC GAAGATGGTGATGGGCTTCC	variabel (empfohlen: 59)	387 bp
Ratte β -Actin	r β Actin v r β Actin r	AGAGGGAAATCGTGCGTGACA CACTGTGTTGGCATAGAGGTC	variabel (empfohlen: 60)	281 bp
Ratte AT_{1a} - Rezeptor	rAT _{1a} v rAT _{1a} r	CTGGCTGATGGCTGGCTTGG TACGCTATGCAGATGGTCATGGG	60	394 bp
Ratte AT_{2} - Rezeptor	rAT ₂ v rAT ₂ r	GAGCATGAGAGGTGGGCACTAAG G AAATAGCGTGCGCTCTATAACTTC AAGG	64	250 bp
Ratte <i>iNOS</i>	rNOS2 v rNOS2 r	GTGTTCCACCAGGAGATGTTG CTCCTGCCCGCTGAGTTCGTC	60	576 bp
Maus GAPDH	mGAPDH v mGAPDH r	AATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC GAAGATGGTGATGGGCTTCC	variabel (empfohlen: 60)	226 bp
Maus AT_{1a} - Rezeptor	mAT _{1a} v mAT _{1a} r	GGAAACAGCTTGGTGGTGAT ACATAGGTGATTGCCGAAGG	56	171 bp
Maus AT_{2} - Rezeptor	mAT ₂ v mAT ₂ r	TAGCATGAGAGGTGAGCACTAAGT AAATAGTGTACTTTCTATAACTGCA AGA	56	253 bp

2.11.1 Agarose-Gel-Elektrophorese

Mittels der Agarose-Gel-Elektrophorese können PCR-Produkte (Amplifikate) in einem elektrischen Feld größenspezifisch aufgetrennt und im Vergleich zu einem Marker definierter Größe identifiziert werden.

Herstellung der Gele. Die Amplifikate der qualitativen RT-PCR wurden in einem 2 %igen (w / v) Agarose-Gel (7 cm × 8 cm bzw. 12 cm × 14 cm) elektrophoretisch getrennt. Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose mit 1-fach Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer, pH 8,0) bestehend aus 40 mM Tris; 20 mM Essigsäure und 1 mM EDTA, mit einem pH-Wert von 8,0 in der Mikrowelle (Severin 800, Sunden) aufgekocht. Die abgekühlte Lösung wurde in einen Gelgießstand der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gegossen

und sogleich ein Gelkamm mit 10 bzw. 20 Geltaschen eingesetzt. Nach Aushärtung des Gels wurde der Gelkamm herausgezogen und das Gel in die mit 1-fach TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (Bio-Rad) eingesetzt.

Auftrennung der Proben. Die aufzutrennenden Proben wurden in die entstandenen Geltaschen pipettiert. Es wurden jeweils 10 μ l Probe mit 3 μ l DNA-Ladungspuffer (30 % (v / v) Glycerin) gemischt und davon 10 μ l in eine Geltasche eingebracht. Als Größenstandard wurden 5 μ l eines DNA-Markers (100 bp *Ladder*, Promega, Madison, Wi; USA), versetzt mit Bromphenolblau, auf das Gel geladen. Dieser Marker setzt sich aus 11 Doppelstrang-Fragmenten mit einer Größe zwischen 100 bp und 1500 bp zusammen. Die Gel-elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 120 V und einer Stromstärke von 160 mA bzw. bei 200 V und 300 mA (Power supply 1000 / 500, Bio-Rad), bis das Bromphenolblau des DNA-Markers das untere Gelende erreichte. Nach Beendigung des Laufvorganges wurde das Gel für 20 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 μ g / ml in A. dest Endkonzentration) inkubiert. Die anschließende Dokumentation erfolgte unter UV-Licht mit Hilfe des Gel-Dokumentationssystems E.A.S.Y RH und dem zugehörigen Computerprogramm EASY Win 32 (Herolab, Wiesloch). Mit der angeschlossenen Digitalkamera (Modell 429 k, Herolab) wurden die Gele fotografiert.

2.12 *Realtime*-RT-PCR

Bei der *realtime*-RT-PCR wird die Akkumulation des PCR-Produktes im PCR-Verlauf zu jeder Zeit gemessen, was die Quantifizierung jeder einzelnen Probe in der jeweiligen exponentiellen Phase der Amplifikation ermöglicht. Dabei wird gleichzeitig die Expression des Zielgens mit der eines nicht regulierten '*Housekeeping Gens*' normalisiert und die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den stimulierten Proben auf eine unbehandelte Kontrollprobe bezogen. Die Berechnung der Ratio erfolgt nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode.

Für den quantitativen Nachweis der Ang II-vermittelten mRNA-Expression bestimmter Rezeptorproteine in isolierter (Kap. 2.9) und *revers* transkribierter (Kap. 2.10) RNA wurde eine *realtime*-RT-PCR, zum Einen unter Verwendung von 'TaqMan[®] Gene Expression Assays' der Firma Applied Biosystems (Darmstadt), und zum Anderen mit dem Sybr[®] Green-System der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt.

2.12.1 *Realtime*-RT-PCR mit dem TaqMan®-System

Das TaqMan®-System (*Assay on Demand*) enthält neben den spezifischen Primern eine signalgebende Exonuklease-Sonde. Diese ist am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (6-Carboxy-Fluorescein (FAM)) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA)) markiert, wobei in einer intakten Sonde der Quencher-Farbstoff die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes unterdrückt. Durch eine Phosphorylierung am 3'-Ende kann die Sonde nicht als *Primer* fungieren, lagert sich aber ebenfalls spezifisch an die zu amplifizierende cDNA an (Hybridisierung). Nach Starten der Polymerisation verlängert die DNA-Taq-Polymerase (AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase, Applied Biosystems), ausgehend vom angelagerten Vorwärtsprimer, den neu zu synthetisierenden DNA-Strang in Richtung hybridisierte Sonde. Durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Taq-Polymerase wird das Reportermolekül der Sonde durch Spaltung verdrängt, wodurch es zu einer räumlichen Trennung von Quencher-Farbstoff und Reporterfarbstoff kommt. Das dadurch entstehende Fluoreszenzsignal ist zu jedem Zeitpunkt proportional der Menge des PCR-Produktes. Für die Quantifizierung wird für jede Probe der Zyklus bestimmt, in dem ein definierter Anstieg der Fluoreszenz in der exponentiellen Phase gemessen wird (C_T -Wert).

Reaktionsansatz.	TaqMan® Universal PCR Master Mix	10,0 µl
	Assay on Demand	1,0 µl
	RNase-freies A. bidest	7,0 µl
	cDNA (50 ng / µl)	2,0 µl

Das Endvolumen im Reaktionsgefäß betrug je Ansatz 20 µl.

Jedes Zielgen wurde in einem Doppel- oder Dreifachansatz quantifiziert. Gleichzeitig erfolgte die Bestimmung der Expression eines nicht regulierten 'Housekeeping Gens' (GAP-DH oder 18S rRNA) anhand der die relative Expression des Zielgens normalisiert wurde.

Primer. Die Primer für die *realtime*-RT-PCR mit dem TaqMan®-System wurden von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) in Form von TaqMan® Gene Expression Assays bezogen und sind in Tab. 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: In der TaqMan® *realtime*-RT-PCR verwendete Primer.

Spezifisches Gen	Bezeichnung	Assay ID
Maus GAPDH	MmGapdH	Mm99999915_g1
18S rRNA	18S rRNA	Hs99999901_s1
Ratte GAPDH	RnGapdH	Rn99999916_s1
Ratte AT ₁ a-Rezeptor	RnAgtr ₁ a	Rn00578456_m1
Ratte AT ₂ -Rezeptor	RnAgtr ₂	Rn00560677_s1
Maus iNos	MmNOS2	Mn00440485_NOS2

Die *realtime*-Reaktion erfolgte mit dem 'ABI Prism 7000 Sequence Detection System 700' (Applied Biosystems) nach folgendem Programm:

<i>realtime</i>-Programm:	Vorinkubation	2 min	50 °C	} 40 Zyklen
	Aktivierung der DNA-Taq-Polymerase	10 min	95 °C	
	Denaturierung	15 sec	95 °C	
	<i>Annealing</i> / Extension	1 min	66 °C	

Die Ergebnisse wurden anschließend mit dem Computerprogramm ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems) ausgewertet.

2.12.2 *Realtime*-RT-PCR mit dem Sybr®Green-System

Der Mastermix (FastStart Universal Sybr® Green Mastermix (Rox), Roche, Mannheim) enthält u. a. Sybr®Green- einen spezifischen Fluoreszenzfarbstoff, der an die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet, wodurch sich sein Fluoreszenzsignal verstärkt.

Während einer PCR entstehen in jedem Zyklus doppelsträngige Kopien des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes, an die sich Sybr®Green kontinuierlich anlagert. So kommt es nach jedem Zyklus, in Abhängigkeit von der Menge an

neusynthetisierten PCR-Produkten, zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität, welche mit Hilfe der *realtime*-RT-PCR-Methode gemessen werden kann. Für die Quantifizierung wird für jede Probe der Zyklus bestimmt, in dem ein definierter Anstieg der Fluoreszenz in der exponentiellen Phase gemessen wird (C_T -Wert).

Reaktionsansatz.	FastStart Universal Sybr Green Master.Mix	12,5 μ l
	Vorwärtsprimer: mNGF v	1,5 μ l
	Rückwärtsprimer: mNGF r	1,5 μ l
	RNase-freies A. bidest	5,5 μ l
	cDNA (25 ng / μ l)	4,0 μ l

Das Endvolumen im Reaktionsgefäß betrug je Ansatz 25 μ l.

Jedes Zielgen wurde in einem Doppelansatz quantifiziert. Gleichzeitig erfolgte die Bestimmung der Expression des nicht regulierten 'Housekeeping Gens' 18S rRNA anhand dessen die relative Expression des Zielgens normalisiert wurde.

Primer. Die Sequenzen der Primer für die *realtime*-RT-PCR mit dem Sybr[®]Green-System wurden mit dem Programm "Primer3 (Kap. 2.11) erstellt und von der Firma MWG Biotech synthetisiert (Kap. 2.11). Die Konzentration der Arbeitsverdünnung betrug 10 pmol / μ l (w / v) und wurde kurz vor Gebrauch hergestellt. In Tab. 2.3 sind die eingesetzten Primer aufgeführt.

Tabelle 2.3: In der Sybr[®]Green *realtime*-RT-PCR verwendete Primer.

spezifisches Gen	Primer	Sequenzen (5'→3')
18S rRNA	18S rRNA v 18S rRNA r	CGGCTACCACATCCAAGGAA GCTGGAATTACCGCGGCT
Maus NGF	mNGF v mNGF r	GCGTTGACAACAGATGAGAAGC CCTCTTCTTGAGCCTTCCTGC

Die *realtime*-Reaktion erfolgte mit dem 'ABI Prism 7000 Sequence Detection System 700' (Applied Biosystems) nach folgendem Programm:

realtime-Programm.	Vorinkubation	2 min	50 °C	} 40 Zyklen
	Aktivierung der DNA-Taq-Polymerase	10 min	95 °C	
	Denaturierung	15 sec	95 °C	
	<i>Annealing</i> / Extension	1 min	66 °C	

Die Ergebnisse wurden anschließend mit dem Computerprogramm ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems) ausgewertet.

2.13 Isolierung von Zell-Proteinen

Die zu untersuchenden Proteine wurden entweder als Gesamtprotein (Kap. 2.13.1) oder als Fraktion der Kernproteine (Kap. 2.13.2) aus den Zellen isoliert.

2.13.1 Isolierung von Kernproteinen

Für die Kernproteinisolierung wurde zunächst das Medium von den Zellen entfernt. Dann wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem Dulbecco's PBS gespült und mit 500 µl frisch angesetztem, eiskaltem Kernprotein-Puffer A (10 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 10 µg / ml Aprotinin) unter Zuhilfenahme eines Zellschabers abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit Deckel überführt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Das Zelllysate wurde für 60 Minuten bei 4 °C inkubiert und im Anschluss daran bei 4 °C für 5 Minuten auf dem Rüttler (Polzin Laborbedarf, Eppendorf) geschüttelt und für weitere 5 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C bei 12000 × g zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Abhängigkeit von der Pelletgröße in 20-50 µl Kernprotein-Puffer B (20 mM HEPES (pH 7,9), 0,4 M NaCl, 0,2 mM EDTA) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 15 Minuten bei 4 °C auf dem Rüttler geschüttelt und anschließend bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert (14000 × g). Der Überstand mit den gelösten Kernproteinen wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, eine photometrische Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt und bis zur Durchführung des EMSA bei -70 °C gelagert.

Proteinbestimmung nach Bradford. Es wurden 10 µl von dem homogenisierten Proteingemisch mit 790 µl A. dest verdünnt und mit 200 µl Bio-Rad-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad) versetzt. Als Protein-Standards dienten 3 Ansätze mit jeweils 10 µl einer 1 mg / ml BSA-Stammlösung, verdünnt mit 780 µl A. dest, welche mit 10 µl Lysispuffer (siehe oben) und 200 µl Bio-Rad-Reagenz versetzt wurden. Der Mittelwert der gemessenen Extinktionen dieser Lösungen entspricht 10 µg Protein. Durch Division dieses Mittelwertes durch 10 wird die Extinktion bestimmt, die 1 µg Protein entspricht. Für die Ermittlung des Leerwertes wurden 10 µl Lysispuffer mit 790 µl A. dest und 200 µl Bio-Rad-Reagenz versetzt. Die Ansätze wurden mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor deren Extinktionen bei einer Wellenlänge von 595 nm mit dem Spectrophotometer U-2000 (Hitachi F2000, Colora Messtechnik GmbH, Hannover) gemessen wurden. Der Proteingehalt der Proben wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Extinktion (Probe)} / \text{Extinktion}_{(1\mu\text{g Protein Standard})} \times 100 (\text{Verdünnungsfaktor}) = x \mu\text{g} / \text{ml Protein.}$$

2.13.2 Isolierung von Gesamtproteinen für Western-Blot-Analysen

Für die Gewinnung von Gesamtproteinen wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem Dulbecco's PBS gespült und je 25 cm² Zellkulturflasche mit 200 µl Lysispuffer (50 mM Tris (pH 7,5); 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 % (v / v) Triton X 100; 2 mM Natriumvanadat; 2,5 mM Natriumpyrophosphat; 1 mM β-Glycerolphosphat und 1 mM Phenylmethyl-sulfonylfluorid in Acetonitril) unter Zuhilfenahme eines Zellschabers (Cell Craper TPP[®]) abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit Deckel überführt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Von dem Zellhomogenat wurde eine photometrische Proteinbestimmung nach Bradford (Kap. 2.13.1) durchgeführt und anschließend 10 µg der isolierten Proteine in ein Eppendorfgefäß pipettiert und mit Natriumdodezylsulfat (SDS)-Probenpuffer (2,3 % (w / v) SDS, 12,5 % (v / v) Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris-HCL, pH 6,8 und 0,4 % (w / v) SDS in A. bidest), 10 % (v / v) Glycerin und 50 mM Dithiotreitol in A. bidest) auf ein Gesamtvolumen von 40 µl aufgefüllt. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 99 °C auf einem Thermoblock (Thermomixer compact, Eppendorf) denaturiert und bei -18 °C eingefroren bzw. nachfolgend in einer SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt.

2.14 Western-Blot

Für den Nachweis der AT₁- und AT₂-Rezeptoren auf Proteinebene wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Mit dieser Methode werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Trägermembran übertragen und fixiert, auf der sie nachfolgend chemisch oder immunologisch detektiert werden können.

2.14.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) für Western Blot

Mit Hilfe der SDS-PAGE können Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dabei werden die Proteine zunächst mit dem stark negativ geladenen Detergenz SDS behandelt, welches sich an die hydrophoben Bereiche der Proteine bindet. Dadurch tragen alle Proteine die gleiche negative Ladung und ein Ladungsfluss wird ausgeschlossen.

Herstellung der Gele für die SDS-PAGE. Die SDS-Gele wurden nach dem Prinzip von Lämmli (Laemmli, 1970) hergestellt, wobei 10 %ige Trenngele und 4,5 %ige Sammelgele gegossen wurden. Zur Herstellung des Trenngels wurden 2,15 ml A. bidest, 1,66 ml einer 30 %igen (w / v) Acryl-/ Bisacrylamidlösung (29:1; Bio-Rad) und 1,3 ml Trenngel-Puffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (Bio-Rad) und 0,4 % (w / v) SDS in A. bidest) gemischt. Durch Zugabe von 15 µl N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (Temed) und 30 µl einer 10 %igen (w / v) Ammoniumpersulfat-Lösung in A. bidest wurde die Polymerisierungsreaktion gestartet. Die Lösung wurde zwischen zwei abgedichtete, durch Abstandshalter getrennte, fettfreie Glasplatten bis etwa zur 7 cm-Markierung nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad) gegossen und anschließend mit Propanol überschichtet. Nach 15 Minuten war das Trenngel polymerisiert und das Propanol wurde abgesaugt. Danach erfolgte das Giessen der Sammelgel-Lösung (ca. 1,5 cm) auf das polymerisierte Trenngel, in die sogleich ein Gelkamm zur Erzeugung von Taschen zur Aufnahme der Proteinproben eingesetzt wurde. Die Lösung für das Sammelgel wurde durch Mischen von 2,89 ml A. bidest, 0,835 ml einer 30 %igen (w / v) Acryl-/ Bisacrylamidlösung (29:1), 1,3 ml Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, und 0,4 % (w / v) SDS in A. bidest) hergestellt. Nach Zugabe von 15 µl Temed und 30 µl einer 10 %igen (w / v) Ammoniumpersulfat-Lösung in A. bidest begann die Polymerisierungsreaktion, die nach 15 Minuten beendet war. Der Kamm wurde entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer (Bio-Rad) eingesetzt.

Vorbereitung und Auftrennung der Proben. Die aufzutrennenden Proteingemische wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und nochmals für 3 Minuten bei 99 °C denaturiert. Anschließend wurden jeweils 20 µl der vorbereiteten Proben in die Gel-Probentaschen eingebracht. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden 5 µl eines Proteinstandards (PAGERuler™ *Prestained Protein Ladder*, Fermentas), eine firmeninterne Zusammensetzung 10 rekombinanter Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10 kD und 170 kD, auf das Gel geladen. Anschließend wurden die Geltaschen vorsichtig mit Elektrodenpuffer (0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % (w / v) SDS, pH 8,3) überschichtet und die Kammer mit Elektrodenpuffer, versetzt mit 10 µl einer gesättigten Bromphenolblau-Lösung, gefüllt. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 400 V und 125 mA (Power Pac 200, Bio-Rad), wobei sich immer 2 Gele gleichzeitig in der Elektrophoreskammer befanden. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn das Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreichte.

2.14.2 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte in einer Elektrodenkammer (Trans-Blot® SD Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad) im Semidryblot-Verfahren. Zur Erleichterung der Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran (7,5 × 7 cm, *Hybound-P PVDF Membrane*, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), wurde diese vorher für 60 Sekunden in Methanol inkubiert und dann für 20 Minuten in Transferpuffer (0,025 M Tris, 192 mM Glycin, 10 % (v / v) Methanol) äquilibriert.

In die Elektrodenkammer wurden 2 Lagen Transferpuffer-befeuchtetes Filterpapier (Whatmann Biometra, Göttingen) geschichtet, auf die die äquilibrierte Nitrozellulosemembran luftblasenfrei aufgelegt wurde. Anschließend wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel auf die Membran gelegt und das Gel mit weiteren 2 Lagen Transferpuffer-befeuchtetem Filterpapier bedeckt. Der Proteintransfer erfolgte bei 25 V und 170 mA für 75 Minuten.

2.14.3 Immunfärbung

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für 60 Minuten in einem Blockierungspuffer (5 % Kasein (w / v) (frema Magermilchpulver; Reformhaus) in TBST-Puffer (20 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % (w / v) Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (Tween 20, Fulka, Neu-Ulm), pH 7,5) unter Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend wurde die Membran mit 1 ml einer Primärantikörperlösung (Verdünnung 1:100 in Blockierungspuffer) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Dabei war die Membran in Folie eingeschweißt. Als primäre Antikörper wurden verwendet: anti AT₁-Rezeptor AT₁ (N-10), anti AT₂-Rezeptor AT₂ (H-143) (Kap. 2.7). Nach der Inkubationszeit wurde die Membran dreimal für je 15 Minuten unter Bewegung mit TBST-Puffer gewaschen, um überschüssige Primärantikörper zu entfernen. Zur Detektion gebundener Primärantikörper wurde die Membran anschließend für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Meerrettich-Peroxidase (*horse-radish-peroxidase*, HRP) konjugierten Sekundärantikörper (Ziege anti Kaninchen IgG, Dianova, Hamburg) inkubiert. Die Verdünnung (1:30000) des Antikörpers erfolgte in Blockierungspuffer. Danach wurde die Membran wiederum dreimal für je 15 Minuten unter Bewegung mit TBST-Puffer gewaschen und für 5 Minuten in 2,5 ml Substratlösung (ECL Western blotting detection reagents, Amersham Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben inkubiert. Die ausgelöste Enzym-Substrat-Reaktion führte zur Freisetzung von Chemilumineszenz.

Im Anschluss daran wurde die Membran sofort faltenfrei in Klarsichtfolie verpackt und in eine lichtdichte Röntgenkassette gelegt (Hypercassette, Amersham Pharmacia Biotech). Auf die Nitrozellulosemembran wurde ein Chemilumineszenz-Film (HyperfilmTM-ECLTM, Amersham Pharmacia Biotech) aufgelegt, bis die optimale Signalstärke erreicht war. Der Film wurde nach Vorschrift des Herstellers entwickelt.

2.15 Untersuchungen zur Lokalisation von NF-κB

Der Transkriptionsfaktor NF-κB kann im Zytoplasma oder im Kern einer Zelle lokalisiert sein. Die Untersuchungen dazu wurden mittels der Immunzytochemie und mittels 'Electrophoretic Mobility Shift Assay' (EMSA) durchgeführt.

Untersuchung mittels Immunzytochemie. Die Untersuchung wurde an Schwannoma-Zellen durchgeführt, die für 1 Stunde mit Ang II stimuliert waren. Die

immunzytochemische Färbung (Kap. 2.6.1) der p65 Untereinheit von NF- κ B erfolgte an den Azeton-fixierten (Kap. 2.6.1) Zellen. Als Primärantikörper wurde anti NF- κ B-p65(A) (200 μ g / ml, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Um die gebundenen Primärantikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz zu detektieren, wurden die Zellen mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (anti Kaninchen-IgG aus dem 'Vectastain Elite ABC-Peroxidase-Kit' (Linaris) in einer Verdünnung von 1:300 für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit Dulbecco's PBS entfernt. Auf die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper folgte eine Zugabe von Extra-Avidin-Fluorescein-Isothiocyanat (Extra-Avidin-FITC) in einer Verdünnung von 1:100 für weitere 45 Minuten. Eine Kernfärbung wurde nicht durchgeführt. Das Eindecken erfolgte wie beschrieben (Kap. 2.6.1.1.2).

Die Betrachtung der Zellen erfolgte mit dem Mikroskop (Axiophot oder Axiovert, Zeiss, Jena). Dabei wurde der Fluoreszenzfarbstoff FITC mit einem Laser der Wellenlänge 495 nm angeregt und fluoreszierte grün. Anhand der grünen Fluoreszenz wurde die Lokalisation von NF- κ B ermittelt. Die Zellen konnten mit einer angeschlossenen Digitalkamera (Axiocam, Zeiss) fotografiert werden. Die Fotos wurden anschließend mit dem Programm Axiovision (Zeiss) archiviert.

Untersuchung mittels EMSA. Diese Methode wird im nachfolgenden Text beschrieben (Kap. 1.15.1).

2.15.1 EMSA

Mit dem '*Electrophoretic Mobility Shift Assay*' (EMSA) lassen sich die Wechselwirkungen von Proteinen mit DNA untersuchen und beispielweise DNA-bindende Proteine, wie Transkriptionsfaktor nachweisen. Bei dieser Methode werden die Proteine mit einer radioaktiv markierten DNA-Sequenz inkubiert und dann in einem nativen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch getrennt. Dabei wird ausgenutzt, dass ungebundene DNA in einem nicht denaturierenden Gel eine höhere elektrophoretische Mobilität besitzt als proteingebundene (*geshiftee*) DNA. Durch anschließendes Auflegen eines Röntgenfilmes werden die Signale sichtbar.

Für den Nachweis der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch Ang II wuchsen Schwannoma-Zellen in 25 cm² Zellkulturflasche in Schwannoma-Medium

(Kap. 2.2) bis zu einer Konfluenz von ca. 95 % der Substratfläche. Die Zellen wurden zweimal mit Medium gespült und anschließend entsprechend des Protokolls für 60 Minuten mit 1 μ M Ang II, 10 μ M Losartan, 10 μ M PD123319, oder der Kombination aus Ang II und Losartan bzw. Ang II und PD123319 stimuliert. Die Kontrollzellen wurden mit Dulbecco's PBS behandelt. Nach der Stimulation wurden die Kernproteine aus den Zellen isoliert (Kap. 2.13.2) und für den nachfolgenden EMSA eingesetzt.

2.15.1.1 Radioaktive Markierung einer NF- κ B-Oligonukleotid-Sonde

Die radioaktive Markierung der NF- κ B-Oligonukleotid-Sonde wurde mit Hilfe des 'NF- κ B-Gel Shift Assay Systems' der Firma Promega (USA) in Anlehnung an das Herstellerprotokoll durchgeführt.

Reaktionsansatz für die Sondenmarkierung.	A. dest	14,0 μ l
	T4-Kinase-Puffer	2,0 μ l
	NF- κ B-Sonde (10 ng)	2,0 μ l
	[³² P]-ATP (10 mCi / ml)	1,5 l
	10 U Polynukleotid-Kinase des Bakteriophagen T4	1,5 μ l

Der Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten bei 37 °C in einem Thermoblock inkubiert. Anschließend war die Sonde markiert.

Nach der Inkubationszeit wurde für eine spätere Radioaktivitätsmessung von der markierten Sonde 1 μ l abgenommen und zusammen mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit in ein Szintillationsröhrchen überführt. Die restliche markierte Sonde wurde mittels einer vorbereiteten 'MicroSpin™ G-25 Säule' von der überschüssigen Radioaktivität gereinigt.

Vorbereitung der Säule. Die 'MicroSpin™ G-25 Säule' wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gestellt und durch Zentrifugation bei 735 \times g aufgebaut. Die angesammelte Flüssigkeit im Eppendorfgefäß wurde verworfen und die Säule in ein neues Eppendorfgefäß gestellt.

Reinigung der Säule. Für die Reinigung der Sonde von überschüssiger Radioaktivität wurde der Reaktionsansatz auf die Säule gegeben und für 2 Minuten

bei 735 × g zentrifugiert. Die gereinigte Sonde wurde auf diese Weise in dem Eppendorfgefäß gesammelt. Von der gereinigten Sonde wurde 1 µl abgenommen und zusammen mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Szintillation Hydroluma, Baker Chemicals, Groß-Gerau) in ein weiteres Szintillationsröhrchen überführt.

Bestimmung der Einbaurates. Zur Bestimmung der Zerfallsrate pro Minute als Maß für die Markierungseffizienz, wurde die freigesetzte Radioaktivität aus der ungereinigten Sonde und der gereinigten Sonde in einem Beta-Counter (Liquid Scintillation Counter Wallac 1409, Wallac-ADL, Freiburg) gemessen und als Signale pro Minute (counts / min, cpm) erfasst. Die Einbaurates der Sonde sollte ca. 30 % betragen und wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Messwert Sonde}_{(\text{gereinigt})} / \text{Messwert Sonde}_{(\text{ungereinigt})} \times 100 \% = x \% \text{ Einbaurates}$$

2.15.1.2 Herstellung des Gels für die PAGE

Die Kernproteine wurden in einem nativen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung des 4 %igen Polyacrylamid-Gels (10 × 12 cm, 0,75 cm Dicke) wurden 23,85 ml A. dest, 1,5 ml eines 10 × TBE-Puffers (0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 0,5 M EDTA, pH 8,0), 3,0 ml einer 40 %igen (w / v) Acrylamidlösung, 750 µl einer 2 %igen (w / v) Bisacrylamidlösung und 938 µl 80 % (v / v) Glycerin gemischt. Durch Zugabe von 22,5 µl Temed und 337,5 µl einer 10 %igen (w / v) Ammoniumpersulfat-Lösung in A. bidest wurde die Polymerisierungsreaktion gestartet.

Die Lösung wurde zwischen zwei abgedichtete, durch Dichtungsgummis getrennte, fettfreie Glasplatten gegossen, die sich in einem Gelgießstand der Firma Biometra (Göttingen) befanden. Für die Erzeugung von Taschen zur Probenaufnahme wurde in das Gel ein Gelkamm eingesetzt. Nach ca. 60 Minuten war das Gel vollständig polymerisiert und wurde nach Entfernung des Gelkammes in die Elektrophoresekammer mit Wasserkühlung (Biometra) eingesetzt, welche mit 0,5 × TBE-Puffer (pH 8,3) gefüllt war.

2.15.1.3 DNA-Gel-Shift

Von der hergestellten NF-κB-Oligonukleotid-Sonde sollten 60000 cpm je Probe eingesetzt werden. Dafür wurde die Sonde zunächst mit sterilem A. bidest verdünnt. Die Ermittlung des Verdünnungsfaktors erfolgte nach folgender Berechnung:

Messwert Sonde_(gereinigt) / 60000 = Verdünnungsfaktor.

Reaktionsansatz für den DNA-Shift.	Gelshift ' <i>binding buffer</i> '	2 µl
	5 µg Kernproteine	7 µl
	Radioaktiv markierte	1 µl
	NF-κB-Oligonukleotid-Sonde	

Das Endvolumen im Reaktionsgefäß betrug 10 µl je Ansatz.

Der Reaktionsansatz wurde für 60 Minuten bei 4 °C inkubiert. Währenddessen wurde ein Vorlauf des Gels für 30 Minuten bei 27 mA (Power Pack 25; Biometra) im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurden jeweils 10 µl des Probenansatzes in die Geltaschen eingebracht. Zur Kontrolle des Elektrophoreselaufes wurde in eine weitere Tasche 5 µl Marker (250 mM Tris-HCl, 40 % (v / v) Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau, pH 7,5) pipettiert. Der Gel-Lauf wurde für ca. 60 Minuten bei 27 mA und 4 °C durchgeführt.

2.15.1.4 Darstellung der Gelshiftbanden

Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel mit einem Whatman-Papier aufgenommen und in Klarsichtfolie gewickelt. Das so vorbereitete Gel wurde in eine Autoradiographiekassette gelegt. Zur Darstellung der Gelshiftbanden wurde auf das Gel ein Autoradiographiefilm (Hyperfilm ECL, Amersham Life Science) aufgelegt, der nach einer Exposition von 12 Stunden bei -70 °C nach Herstellerangaben entwickelt wurde.

2.16 Proliferationsbestimmung durch ³H-Thymidin-Inkorporation

Proliferierende Zellen synthetisieren DNA, welche über den Einbau von [Methyl 1',2'-³H]-Thymidin (³H-Thymidin) in die neusynthetisierte DNA in einem Beta-Counter detektiert werden kann.

Zur Untersuchung des Einflusses von Ang II auf die Proliferation der untersuchten Zellen wurden diese in einer definierter Zellzahl in 24-Loch Gewebekulturplatten (Sarstedt) ausgesät. Dort wuchsen sie in dem für die jeweilige Zellart vorgesehenen Medium für 24 Stunden im Inkubator. Nach anschließendem Spülen mit Medium erfolgte die Stimulation der Zellen für 24 Stunden in einem Mehrfachansatz. Dafür

wurden die Zellen in serumarmem Medium (0,5 % (v / v) FKS), versetzt mit den verschiedenen Stimulanzen, inkubiert. Während der letzten 6 Stunden der eintägigen Stimulation wurden zu den Zellen zusätzlich 1 mCi / ml ^3H -Thymidin gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit Dulbecco's PBS gewaschen und für 5 Minuten mit Methanol auf Eis fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit einer 10 %-igen (v / v) Trichloressigsäure auf Eis behandelt. Nach erneutem Waschen der Zellen mit Dulbecco's PBS wurden diese durch die Zugabe von 500 μl einer 0,3 M Natronlauge (NaOH) auf Eis abgelöst. Nach 30 Minuten wurden zur Neutralisation der Natronlauge 500 μl 0,3 M Salzsäure (HCl) pipettiert und das Gesamtvolumen (1 ml) der Probe in ein 7 ml-Röhrchen (Sarstedt) überführt. Die Probe wurde mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt und für ca. 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die aus den Zellen freigesetzte Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Beta-Counters (Liquid Scintillation Counter Wallac 1409) gemessen.

2.17 Untersuchungen zum Nervenwachstumsfaktor NGF

Die Untersuchung des Einflusses verschiedener Stimulanzen auf NGF wurde an Schwannoma-Zellen mittels einer *realtime*-RT-PCR (Kap. 2.12) auf mRNA-Ebene und mittels eines NGF-Sandwich-ELISA (Kap. 2.17.1) auf Protein-Ebene durchgeführt.

Untersuchung mittels *realtime*-RT-PCR. Die Untersuchung wurde mittels *realtime*-RT-PCR mit dem Sybr[®]Green-System unter Verwendung der folgenden Primer: Maus NGF und 18S rRNA (Tab. 2.3) durchgeführt. Die Versuchsdurchführung wurde in Kap. 2.12.2 beschrieben.

Untersuchung mittels NGF-Sandwich-ELISA. Diese Methode wird im nachfolgenden Text beschrieben (Kap. 2.17.1).

2.17.1 NGF-Sandwich-ELISA

Zur Quantifizierung der Ang II-vermittelten Freisetzung von NGF aus Schwannoma-Zellen wurde ein NGF-Sandwich-ELISA (ChemiKine[®]Nerve Growth Factor (NGF) Sandwich ELISA Kit CYT304, Chemicon, Temecula, CA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieser Test hatte eine Sensitivität von 10 bis 15 pg / ml und ermöglichte die Messung von NGF in Konzentrationen zwischen 10 pg / ml und 1000 pg / ml im Zellkulturüberstand.

Für die Gewinnung der Zellkulturüberstände wurden die Zellen mit einer definierten Zellzahl in 6-Loch Gewebekulturplatten ausgesät. Dort wuchsen sie für 24 Stunden, bevor sie mit Medium gewaschen und anschließend für weitere 24 oder 48 Stunden mit verschiedenen Ang II-Konzentrationen in 2 ml frischem Medium stimuliert wurden. Die Stimulationen erfolgten jeweils in Doppelansätzen. Nach der Stimulation wurde das Medium mit einer Pipette abgenommen, in ein 1 ml Eppendorfgefäß überführt und kurz zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf). Im Anschluss daran wurden die NGF-Konzentrationen in den Überständen in einem Dreifachansatz mittels des oben genannten ELISA bestimmt. Dabei wurde die optische Dichte (OD) in den Kavitäten der ELISA-Platte am Ende der Versuchsdurchführung bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Photometer (EAR 340 ATTC, Tecan GmbH, Crailsheim / SLT Labinstrumente, Grödy, Österreich) gemessen. Zur Berechnung der Menge an freigesetztem NGF wurden bei jedem ELISA Standards mit definierten NGF-Konzentrationen mitgeführt. Anhand dieser Standards (10 pg / ml bis 1000 pg / ml NGF) wurde eine Standardkurve ermittelt und die NGF-Konzentrationen in den Überständen damit berechnet. Die Messwerte wurden grafisch dargestellt und repräsentierten die Konzentrationen an NGF in den Zellkulturüberständen.

2.18 Untersuchungen zur induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und zur Freisetzung von NO

Die Untersuchung des Einflusses verschiedener Stimulanzen auf die Freisetzung von NO in den Zellkulturüberstand wurde mittels des Griess-Reagenz an Schwannoma-Zellen durchgeführt. Die Untersuchungen auf mRNA-Ebene zur Expression und Regulation der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) erfolgten mit einer RT-PCR und mittels einer *realtime* RT-PCR an Schwannoma-Zellen.

Untersuchung mittels RT-PCR. Für die Untersuchung der iNOS in den Schwannoma-Zellen wurden diese für 24 Stunden mit Ang II sowie mit der Kombination aus IFN- γ und TNF- α stimuliert, bevor die RT-PCR-Untersuchung folgte. Es wurden die Primer Maus-iNOS und Maus-GAPDH (Tab. 2.1) eingesetzt. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie beschrieben (Kap. 2.11).

Untersuchung mittels realtime-RT-PCR. Die Untersuchung mittels *realtime*-RT-PCR wurde mit dem TaqMan[®]-System unter Verwendung der folgenden 'TaqMan[®] Gene Expression Assays': MmNOS2 und MmGapdH (Tab. 2.3) durchgeführt. Die Versuchsdurchführung wurde in Kap. 2.12.1 beschrieben.

Untersuchung der NO-Freisetzung mittels des Griess-Reagenz. Diese Methode wird im nachfolgenden Text beschrieben (Kap. 2.18.1).

2.18.1 Messung von NO im Zellkulturüberstand

Das von den Zellen produzierte NO hat nur eine Halbwertszeit von 6 bis 10 Sekunden. Es reagiert aber mit Wasser (H₂O) und Hydroxid-Ionen (OH⁻) zu den stabilen Endprodukten Nitrit (NO₂) und Nitrat (NO₃). Dabei wird angenommen, dass die Menge an akkumuliertem Nitrit der Menge an produziertem NO proportional ist. Die Nachweismethode für die NO₂-Konzentration im Zellkulturüberstand ist die Griess-Reaktion (Romero-Graillet *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1996). Dabei reagiert das gebildete NO₂ mit Sulfanilamid zu einem Diazoniumsalz, welches dann mit N-(1-Naphtyl)-ethylendiamin einen Azofarbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 550 nm, bildet.

Zunächst wurden die Zellen mit einer definierten Zellzahl in einer 96er-Flachboden-Mikrotiterplatte ausgesät. Dort wuchsen sie für 24 Stunden, bevor sie mit Medium gewaschen und anschließend für weitere 24 oder 48 Stunden mit den verschiedenen Stimulanzen in 200 μ l frischem Medium stimuliert wurden. Die Stimulationen erfolgten jeweils in Mehrfachansätzen. Für die anschließende Bestimmung der NO₂-Konzentration in den Zellkulturüberständen wurden in einer 96er-Flachboden-Mikrotiterplatte je 100 μ l Griess-Reagenz und 100 μ l Zellkulturüberstand gemischt und nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 540 nm in einem Photometer (EAR 340 ATTC, Tecan GmbH, Crailsheim / SLT Labinstruments, Grödy, Österreich) gemessen. Zur Berechnung der Menge an produziertem Nitrit wurden bei jeder Messung Standards

mitgeführt, anhand derer eine Standardkurve ermittelt wurde. Als Standard diente dabei in Zellkulturmedium gelöstes Natriumnitrit (NaNO_2) in Konzentrationen von 3,125 $\mu\text{g} / \text{ml}$ bis 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Die Messwerte wurden grafisch dargestellt und repräsentierten die Konzentrationen an Stickoxid (NO) in den Zellkulturüberständen.

2.19 Untersuchungen zur Apoptose-Induktion durch Ang II

Apoptose ist der programmierte Tod einer Zelle durch Selbstzerstörung. Er kann von der Nekrose durch seinen hochregulierten Ablauf ohne Auslösung einer Entzündungsreaktion unterschieden werden. Hat eine Zelle die Apoptose eingeleitet, kommt es u. a., durch die Aktivität von Caspasen, zu einer DNA-Degradation, aus der Oligonukleotidfragmente mit einer Länge von 180 – 200 bp oder einem Vielfachen davon hervorgehen. Diese typisch fragmentierte DNA (*'DNA-Laddering'*) kann biochemisch mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese dargestellt werden und gilt als Apoptosenachweis.

2.19.1 DNA-Laddering

Für die Untersuchungen zur möglichen Apoptose-Induktion durch Ang II wurden Schwannoma-Zellen in 75 cm^2 Zellkulturflaschen in folgender Zellzahl ausgesät: für eine 24-stündige Stimulation 500·000 Zellen, für eine 48-stündige Stimulation 800·000 und für eine 72-stündige Stimulation 1·200·000 Zellen. Dort wuchsen sie zunächst für 24 Stunden, bevor sie für weitere 24, 48 oder 72 Stunden mit verschiedenen Ang II-Konzentrationen bzw. mit 10 μM Rotenon als Positivkontrolle in 4 ml serumarmen (0,5 % FKS) Medium stimuliert wurden. Die Kontrollzellen blieben unstimuliert. Nach der Stimulation wurde das Medium entfernt, die Zellen mit Dulbecco's PBS gespült und mit einem Zellschaber (Cell Craper, 24 cm) abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Eppendorfgefäße überführt und für 5 Minuten bei 1600 \times g (Centrifuge 5804 R, Eppendorf) mit Dulbecco's PBS gewaschen, um anschließend die DNA zu isolieren.

DNA-Isolierung

Die Pellets der abgelösten Zellen wurden in je 50 μl Lysepuffer (50 mM Tris-HCL, 20 mM EDTA, 1 % (v / v) Tergitol[®]-Typ 40 (NP 40), pH 7,5) resuspendiert und gleichzeitig lysiert. Die Lysate wurden zentrifugiert (1600 \times g, 5 Minuten, Centrifuge 5415 R, Eppendorf) und die Überstände (Ü 1) in je ein Eppendorf-Gefäß überführt.

Die Pellets der Lysate wurden erneut in 50 µl Lysepuffer resuspendiert, die Resuspensionen zentrifugiert (1600 × g, 5 Minuten, Centrifuge Centrifuge 5415 R, Eppendorf) und die Überstände (Ü 2) in dieselben Eppendorf Gefäße überführt, in denen sich bereits die ersten Überstände (Ü 1) befanden. Zu den jeweils vereinigten Überständen (Ü 1 + Ü 2) wurden 10 µl einer 10 %igen (w / v) SDS-Lösung und 20 µl RNase A (Ribonuclease A aus dem Rinderpankreas) in einer Konzentration von 20 mg / ml pipettiert und die Ansätze für 2 Stunden im Heizblock bei 56 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde 25 µl Proteinase K (Proteinase K aus Tritirachium album) in einer Konzentration von 10 mg / ml dazu pipettiert und die Ansätze für weitere 2 Stunden bei 37 °C inkubiert (Inkubator HeraCell, Heraeus). Anschließend wurde die DNA gefällt, indem zu den Ansätzen je 50 µl einer 10 M Ammoniumacetat-Lösung sowie 500 µl absoluter Ethanol (100 %, eiskalt) pipettiert wurde. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (12000 × g, 15 Minuten, Centrifuge 5415 R, Eppendorf) gewonnen. Nachdem das DNA-Pellet luftgetrocknet war, wurde es in Abhängigkeit von der Größe in 15 bis 25 µl Probenpuffer (10 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und die DNA-Konzentration bestimmt.

Quantifizierung der DNA. 5 µl der in DNA-Probenpuffer gelösten DNA wurden in 995 µl Messpuffer (Kap. 2.9) aufgenommen, in eine Küvette überführt und die DNA in einem Spektrophotometer (Ultraspec 3100 *pro*, Amersham Biosciences, Freiburg) quantifiziert. Aus der Absorption, gemessen bei 260 nm, ergab sich die Menge an DNA wobei 50 µg / ml DNA einer optischen Dichte (OD) von 1 entsprach.

Auftrennung und Darstellung der DNA-Fragmente. Die DNA bzw. die Oligonukleotidfragmente wurden mittels der Agarose-Gel-Elektrophorese in einem elektrischen Feld größenspezifisch aufgetrennt und im Vergleich zu einem Marker definierter Größe (100 bp Leiter) identifiziert. Die anschließende Dokumentation erfolgte nach einer 30-minütigen Ethidiumbromid-Behandlung des Gels unter UV-Licht. Mit einer angeschlossenen Digitalkamera wurden die Gele fotografiert (Kap. 2.11.1).

2.20 Histologische Untersuchungen

Im Anschluss an die *in vitro* Experimente wurden histologische Untersuchungen am *N. ischiadicus* durchgeführt. Dafür wurden Nervensegmente 10 mm distal einer Quetschläsion des *N. ischiadicus* aus getöteten erwachsenen Sprague Dawley Ratten präpariert, welche zuvor Testreihen zur Untersuchung der funktionellen Nervenregeneration nach einer chronischen, lokalen Applikation von Ang II unterzogen wurden.

Diese Nervensegmente wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Th. Unger (Pharmakologisches Institut des UK SH; Campus Kiel) zur Verfügung gestellt.

2.20.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Nach Einbettung in Tissuetek[®] wurden die Nervensegmente der *Nn. ischiadici* (Kap. 2.20) bei einer Temperatur von -20 °C in 5 µm dünne und ca. 10 mm lange Sektionen geschnitten (Kryostats Frigocut-E 2800, Reichert Jung, Leica Service, Bensheim). Die Schnitte wurden mit gelatinierten Objektträgern aufgenommen und entweder einer sofortigen Färbung unterzogen oder bei -20 °C bis zur späteren Verwendung eingefroren.

2.20.2 Immunhistochemie

Mittels der Immunhistochemie lassen sich exprimierte Proteine in einem histologischen Schnitt sichtbar machen. Dafür wurden die Gefrierschnitte zunächst mit 1 ml eiskaltem Azeton für 10 Minuten im Kühlschrank fixiert. Nach der Fixierung wurden die Schnitte dreimal mit Dulbecco's PBS gespült und für 60 Minuten mit einem Primärantikörper gegen das gesuchte Protein in einer Feuchtkammer inkubiert. Zur Detektion regenerierender Nervenfasern wurde der polyklonale Primärantikörper anti GAP-43 in einer Verdünnung von 1:400 in 0,75 % (w / v) BSA in Dulbecco's PBS verwendet. Nach der Inkubationszeit wurden ungebundene Antikörper dreimal mit Dulbecco's PBS ausgewaschen. Die anschließende Detektion der gebundenen Primärantikörper wurde Enzym-Substrat-spezifisch mit dem Chromogen DAB durchgeführt.

2.20.2.1 Enzym-Substrat-spezifische Detektion

Die Enzym-Substrat-spezifische Detektion des gebundenen Primärantikörpers wurde nach Herstellerangaben mit Substanzen aus zwei gebrauchsfertigen Sets durchgeführt (Kap. 2.6.1.1.1). Es wurden keine Zellkerne gefärbt. Nach der Färbung wurden die Schnitte eingedeckt.

Eindecken. Auf die Objektträger mit den gefärbten Schnitten wurde 1 Tropfen Aquatex[®] gegeben und die Schnitte unter Zuhilfenahme einer Pinzette luftblasenfrei mit Deckgläsern abgedeckt. Nach einer Trockenzeit von ca. 45 min konnten die gefärbten Schnitte mikroskopiert werden.

Mikroskopie. Die gefärbten Schnitte wurden unter einem Mikroskop (Axiophot, Zeiss, Jena) ausgewertet und mit der angeschlossenen Digitalkamera (Axio-Cam) fotografiert.

2.21 Myelinscheidenfärbung an Semidünnschnitten

Die Myelinscheidenfärbung wurde an semidünnen Querschnitten des *N. ischiadicus* durchgeführt. Nach einer 2-stündigen Fixierung in 6 % (v / v) Glutaraldehyd wurden die entnommenen Nervensegmente für 24 Stunden bei 4 °C in eine 3 %ige (v / v) Glutaraldehyd-Lösung umgesetzt und anschließend in Araldit eingebettet. Von den eingebetteten Nerven wurden mit Hilfe des Ultramikrotoms EM UCU (Leica Service, Bensheim) Semidünnschnitte mit einer Dicke von 1 µm angefertigt, welche anschließend nach der Methode von Estable-Puig *et al.* (1965) mit Paraphenyldiamin gefärbt wurden.

2.22 Statistische Auswertung

Die repräsentierten Werte in den Diagrammen, mit Ausnahme der Werte in dem Kreisdiagramm (Abb. 3.7.B), sind als Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Evaluation der gemessenen Parameter erfolgte, über eine einfaktorische Varianzanalyse (*one-way* ANOVA) mit dem Programm GraphPad PRISM 3 (GraphPad Software, San Diego, USA). Ein Vergleich der einzelnen Messgruppen erfolgte nach Bonferroni. Die Unterschiede zwischen den Messgruppen wurden als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ war.

3 Ergebnisse

Der vorliegenden Arbeit vorangegangene *in vivo* Studien zur Untersuchung der funktionellen Regeneration peripherer Nerven zeigten, dass Ang II den Regenerationsverlauf verletzter Nerven signifikant beschleunigte (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Th Unger, Pharmakologisches Institut des UK SH; Campus Kiel; Reinecke *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit sollte *in vitro* dieser positive Einfluss von Ang II auf die Regeneration peripherer Nerven näher untersucht werden. Schwann-Zellen und Axone sind *in vivo* eng miteinander assoziiert. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Hypothese nachgegangen, dass Ang II modulierend auf Schwann-Zellen einwirken und dadurch die periphere Nervenregeneration verbessern kann. Die Untersuchungen sollten an permanenten Schwann-Zellen einer Tumor-Zelllinie (Schwannoma-Zellen) und / oder an primären Schwann-Zellen durchgeführt werden. Dafür sollte eine Methode zur Kultivierung primärer Ratten-Schwann-Zellen etabliert werden.

3.1. Isolierung, Kultivierung und Phänotypisierung primärer Schwann-Zellen

Die primären Schwann-Zellen wurden durch mechanische und enzymatische Dissoziation aus *Nn. ischiadici* und / oder Spinalganglien von 12 bis 15 Wistar-Ratten am postnatalen Tag 2 (P₂-Ratten) isoliert (Kap. 2.3, Abb. 2.1). Die isolierten Zellen wurden in PDL-beschichtete Zellkulturflaschen in Schwann-Zell-Medium, supplementiert mit 2 µM Forskolin, ausgesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 80 - 90 % der Substratfläche kultiviert. Dabei erleichterte die PDL-Beschichtung den Zellen die Adhäsion an den Boden der Zellkulturflasche. Zwei Tage nach Anlegen einer primären Schwann-Zell-Kultur begannen die adhärennten Schwann-Zellen ihre anfangs kugelige Gestalt durch die Ausbildung von langen, untereinander kontaktierenden Fortsätzen zu ändern, wobei der Zelleib ein spindelförmiges Aussehen annahm (Abb. 3.1). Nach ca. 7 Tagen in Kultur hatten die Zellen eine Konfluenz von 80 – 90 % der Substratfläche erreicht und waren der Phänotypisierung nach nahezu frei von Fibroblasten. Bestanden die Kulturen zu

mindestens 80 % aus Schwann-Zellen, so wurden sie als 'reine Schwann-Zell-Kulturen' für Versuche eingesetzt.

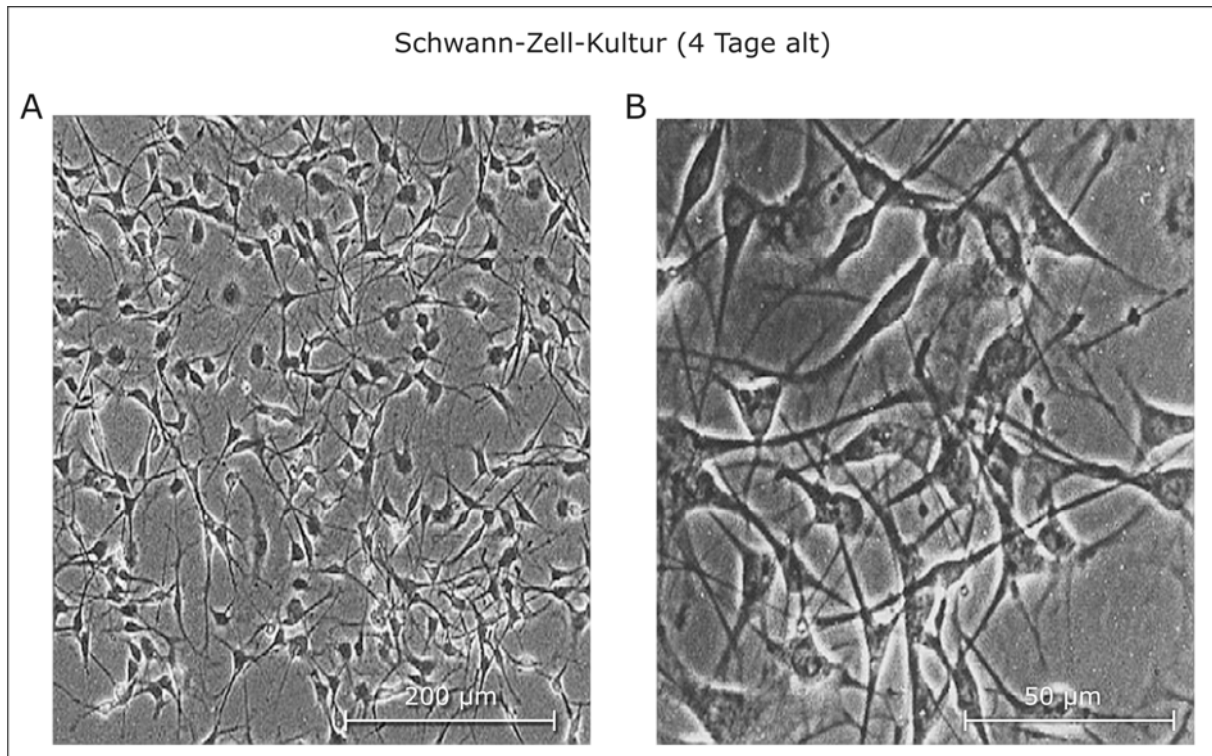


Abb. 3.1: Phasenkontrastmikroskopische Darstellung einer repräsentativen primären Schwann-Zell-Kultur. Schwann-Zellen wurden aus Spinalganglien früh-postnataler Wistar-Ratten (P₂-Ratten) isoliert und in Kultur genommen. Die Kultur wurde nach 4 Tagen mit unterschiedlichen Vergrößerungen fotografiert (A+B). **A:** Der Maßstabsbalken repräsentiert eine Strecke von 200 µm. **B:** Der Maßstabsbalken repräsentiert eine Strecke von 50 µm

3.1.1 Phänotypisierung der primären Schwann-Zell-Kulturen

Schwann-Zellen tragen den membrangebundenen Rezeptor p75^{LNGF} auf ihrer Oberfläche (Tan *et al.*, 2003) und können demzufolge über diesen Rezeptor detektiert werden.

Zunächst wurde mittels Immunfärbung überprüft, ob die Schwann-Zellen, die in dieser Arbeit eingesetzt werden sollten, den p75^{LNGF}-Rezeptor tragen und, ob die Schwann-Zellen aus den Primärkulturen selektiv über diesen Rezeptor mittels eines Rezeptor-spezifischen Antikörpers markiert werden können. Dabei wurden zwei Methoden zur Detektion gebundener p75^{LNGFR}-Antikörper miteinander verglichen.

3.1.1.1 Die selektive Markierung von Schwann-Zellen über die Detektion ihrer p75^{LNGF}-Rezeptoren

Die p75^{LNGF}-Rezeptoren wurden immunzytochemisch an Schwannoma-Zellen und an primären Schwann-Zellen mit Hilfe eines polyklonalen p75^{LNGFR}-spezifischen Antikörpers detektiert, dessen Bindung, und damit die Existenz der p75^{LNGF}-Rezeptoren, anschließend Enzym-Substrat-spezifisch mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und dem Chromogen DAB sowie durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper aufgezeigt wurde. Die Untersuchungsergebnisse wurden fotografiert.

Nach der immunzytochemischen Färbung der p75^{LNGF}-Rezeptoren nahmen diese durch die Enzym-Substrat-spezifische Reaktion von Biotin und DAB eine braune Farbe an. Dadurch konnten sie lichtmikroskopisch gut auf den Schwannoma-Zellen (Abb. 3.2 B) und auf den primären Schwann-Zellen (Abb. 3.3 B) detektiert werden. Die Kontrollzellen blieben ungefärbt (Abb. 3.2 A und 3.3 A), womit eine unspezifische Bindung des biotinylierten Sekundärantikörpers ausgeschlossen war. Da die p75^{LNGF}-Rezeptoren auf der gesamten Oberfläche von Schwann-Zellen verteilt sind, war gleichzeitig die unterschiedliche Morphologie der Schwannoma-Zellen und der primären Schwann-Zellen gut zu erkennen. Die Schwannoma-Zellen wiesen eine astrozytenähnliche Morphologie auf (Abb. 3.2), während primäre Schwann-Zellen den Schwann-Zell-charakteristischen spindelförmigen Zelleib mit zahlreichen Fortsätzen hatten (Abb. 3.3).

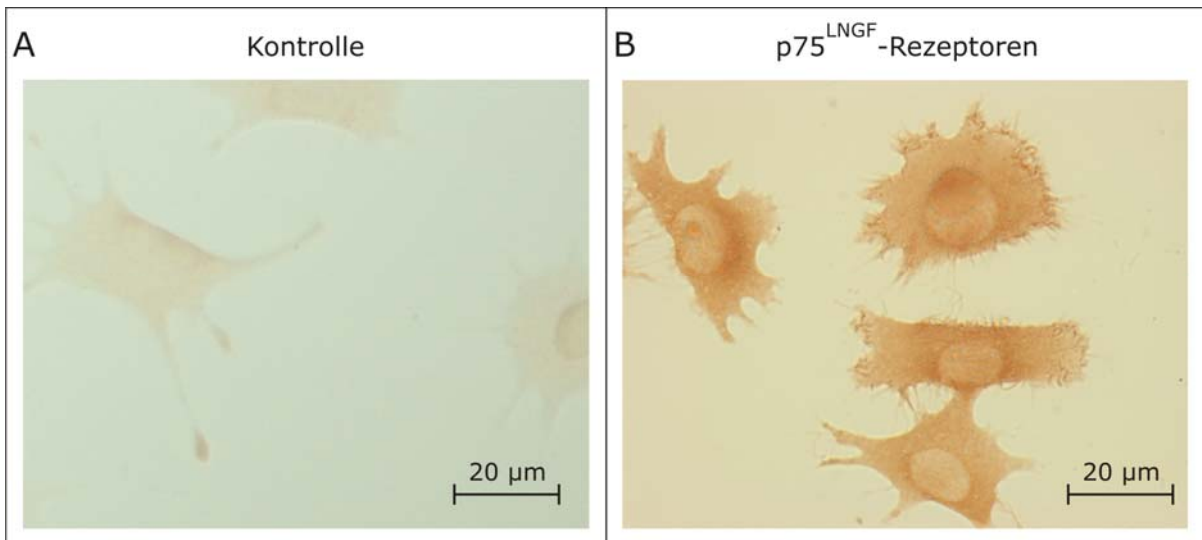


Abb. 3.2: Lichtmikroskopische Darstellung von p75^{LNGFR} / DAB-gefärbten Schwannoma-Zellen. Schwannoma-Zellen wurden auf PDL-beschichteten Deckgläsern für 24 Stunden kultiviert, mit Azeton fixiert und anschließend mit dem Primärantikörper anti p75^{LNGFR} als Schwann-Zell-Marker inkubiert. Die Detektion gebundener Primärantikörper erfolgte Enzym-Substrat-spezifisch mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und dem Chromogen DAB. **A:** ungefärbte Kontrollzellen. **B:** braun gefärbte p75^{LNGF}-Rezeptoren auf Schwannoma-Zellen.

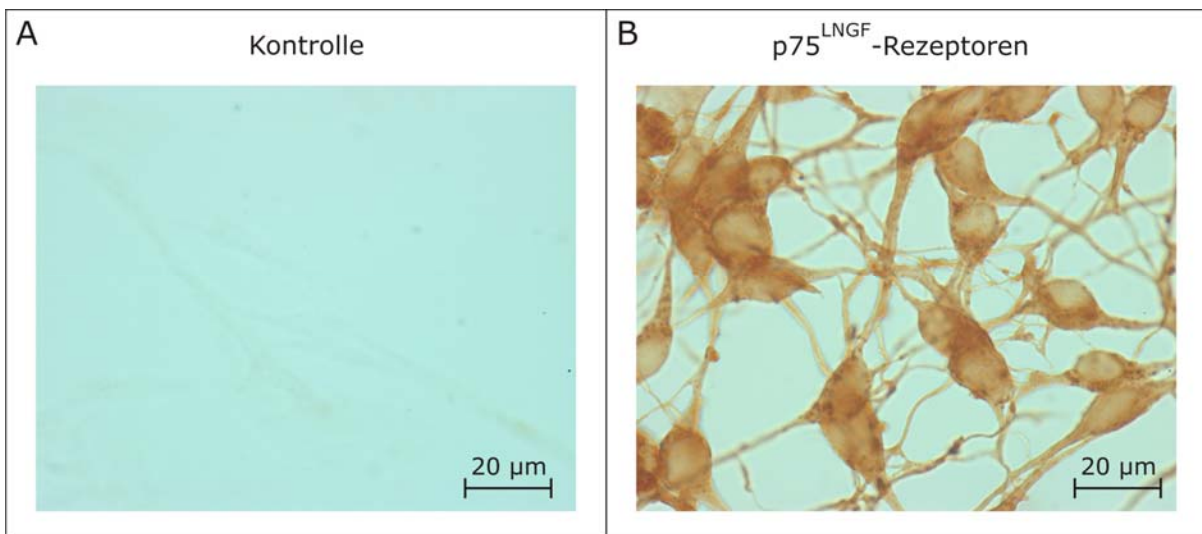


Abb. 3.3: Lichtmikroskopische Darstellung von p75^{LNGFR} / DAB-gefärbten primären Schwann-Zellen. Primäre Schwann-Zellen wurden auf PDL-beschichteten Deckgläsern für 24 Stunden kultiviert, mit Azeton fixiert und anschließend mit dem Primärantikörper anti p75^{LNGFR} als Schwann-Zell-Marker inkubiert. Die Detektion gebundener Primärantikörper erfolgte Enzym-Substrat-spezifisch mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und dem Chromogen DAB. **A:** ungefärbte Kontrollzellen. **B:** braun gefärbte p75^{LNGF}-Rezeptoren auf primären Schwann-Zellen.

Um zu überprüfen, ob die Schwann-Zellen auch selektiv in einer Mischkultur aus Schwann-Zellen und Fibroblasten markiert werden können und, um auszuschließen, dass die p75^{LNGF}-Rezeptoren auch auf Fibroblasten nachzuweisen sind, wurde die Zellpopulation einer Spinalganglien-Mischkultur ebenfalls immunzytochemisch auf das Vorhandensein von p75^{LNGF}-Rezeptoren überprüft.

Die $p75^{\text{LNGF}}$ -Rezeptoren wurden auch in Mischkulturen selektiv auf den Schwann-Zellen und nicht auf Fibroblasten nachgewiesen (Abb. 3.4).

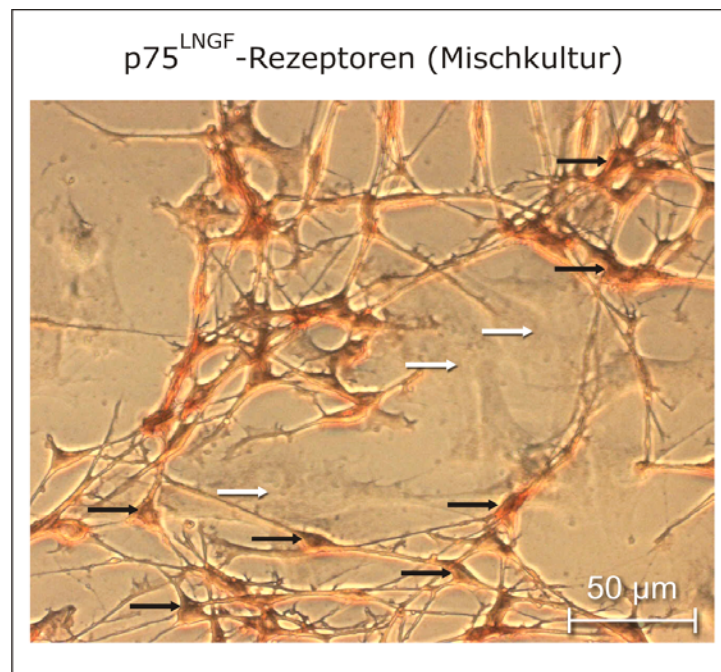


Abb. 3.4: Lichtmikroskopische Darstellung einer $p75^{\text{LNGFR}}$ / DAB-gefärbten Spinalganglien-Mischkultur. Zellen einer Mischkultur wurden auf PDL-beschichteten Deckgläsern für 24 Stunden kultiviert, mit Azeton fixiert und mit dem Primärantikörper anti $p75^{\text{LNGFR}}$ als Schwann-Zell-Marker inkubiert. Die Detektion des gebundenen Primärantikörpers erfolgte Enzym-Substrat-spezifisch mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und dem Chromogen DAB. Die $p75^{\text{LNGF}}$ -Rezeptoren auf den Schwann-Zellen färbten sich braun, während auf den Fibroblasten diese Rezeptoren nicht detektiert wurden. Die schwarzen Pfeile zeigen auf einige DAB-gefärbten Schwann-Zellen, während die weißen Pfeile die typischerweise unter den Schwann-Zellen wachsenden Fibroblasten markieren.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob sich die $p75^{\text{LNGF}}$ -Rezeptoren auch immunzytochemisch mittels indirekter Immunfluoreszenz detektieren lassen, um dann eine von den beiden Immunfärbemethoden als Standardmethode für die Phänotypisierung der Schwann-Zell-Kulturen einzusetzen. Der Rezeptornachweis mittels Immunfluoreszenz erfolgte ebenfalls mit dem Rezeptor-spezifischen Antikörper anti $p75^{\text{LNGFR}}$, dessen Bindung nachfolgend mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper anhand einer roten Fluoreszenz detektiert wurde.

Nach erfolgter Immunfluoreszenz-Färbung der $p75^{\text{LNGF}}$ -Rezeptoren war über den gesamten Zellkörper von Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen eine punktuelle Rot-Färbung sichtbar (Abb. 3.5 B und 3.6 B). Die Zellkerne fluoreszierten aufgrund einer Bisbenzimid-Gegenfärbung blau (Abb. 3.5 A und Abb. 3.6 B).

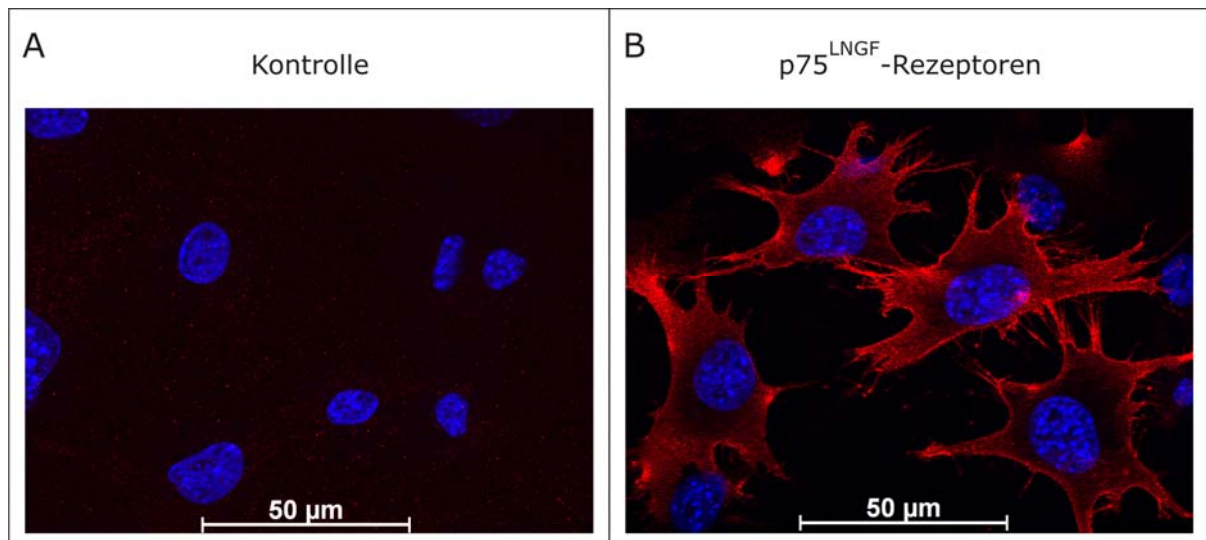


Abb. 3.5: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der $p75^{\text{LNGF}}$ -Rezeptoren auf Schwannoma-Zellen. Schwannoma-Zellen wurden auf PDL-beschichteten Deckgläsern für 24 Stunden kultiviert und mit Zamboni-Fixierlösung fixiert. Der Rezeptornachweis erfolgte mit dem Primärantikörper anti $p75^{\text{LNGFR}}$ als Marker für Schwann-Zellen. Die Detektion des gebundenen Primärantikörpers erfolgte durch einen rot fluoreszierenden Sekundärantikörper (anti Kaninchen-IgG-Cy3). Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid gegengefärbt und fluoreszierten blau. Abb. **A** zeigt Schwannoma-Zellen, die ohne Primärantikörper, jedoch mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden, Abb. **B** zeigt die rot fluoreszierenden $p75^{\text{LNGF}}$ -Rezeptoren als Schwann-Zell-Marker auf den Schwannoma-Zellen.

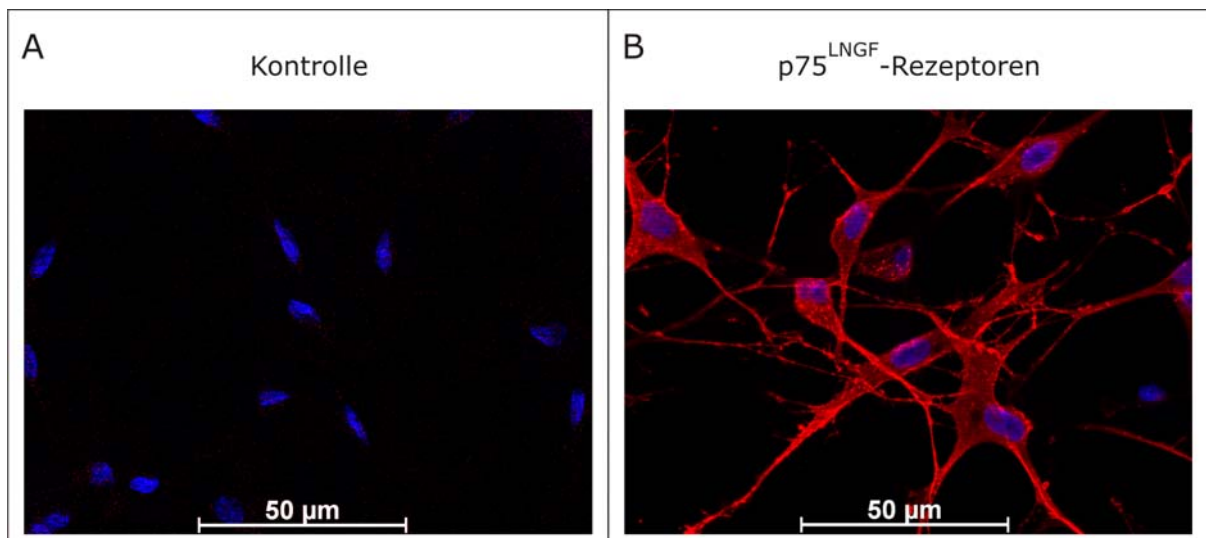


Abb. 3.6: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der $p75^{\text{LNGF}}$ -Rezeptoren auf primären Schwann-Zellen. Schwann-Zellen wurden auf PDL-beschichteten Deckgläsern für 24 Stunden kultiviert und mit Zamboni-Fixierlösung fixiert. Der Rezeptornachweis erfolgte mit dem Primärantikörper anti $p75^{\text{LNGFR}}$ als Marker für Schwann-Zellen und einem rot fluoreszierenden Sekundärantikörper (anti Kaninchen-IgG-Cy3). Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid gegengefärbt und fluoreszierten blau. Abb. **A** zeigt Schwann-Zellen, die ohne Primärantikörper, jedoch mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden, Abb. **B** zeigt die rot fluoreszierenden $p75^{\text{LNGF}}$ -Rezeptoren als Schwann-Zell-Marker auf den Schwann-Zellen.

Sowohl der verwendete Antikörper als auch die beiden eingesetzten Methoden waren geeignet, um die p75^{LNGF}-Rezeptoren selektiv auf Schwann-Zellen zu markieren, wodurch eine Phänotypisierung der Schwann-Zell-Kulturen über eine Detektion der p75^{LNGF}-Rezeptoren möglich wurde.

Als weiteres Ergebnis dieser Versuche zeigte sich die Notwendigkeit einer PDL-Beschichtung der Deckgläser für das Anheften der primären Zellen und, dass dem serumfreien Schwann-Zell-Medium 0,5 % FKS zugegeben wurde (ohne Abb.).

3.1.1.2 Immunzytochemische Phänotypisierung der Schwann-Zell-Kulturen

Für die Phänotypisierung der Schwann-Zell-Kulturen wurde als Methode die immunzytochemische Bestimmung des Anteiles an Schwann-Zellen in einer neuen Primärkultur gewählt, da mit dieser Methode eine lang anhaltende Färbung der Schwann-Zellen möglich war. Bei der Immunfluoreszenzfärbung dagegen wurde die Farbtintensität bei längerer Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop immer schwächer, so dass bei längeren Betrachtungen die Präparate verblassten.

Die immunzytochemische Phänotypisierung einer primären Schwann-Zellkultur erfolgte mit dem Primärantikörper p75^{LNGFR}, dessen Bindung nachfolgend mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und dem Chromogen DAB detektiert wurde (Kap. 2.6.1.1).

Die braun angefärbten p75^{LNGF}-Rezeptoren auf den Zellen markierten eindeutig die Schwann-Zellen, während die Fibroblasten ungefärbt blieben (Abb. 3.7 A). Der prozentuale Anteil an Schwann-Zellen in einer Kultur wurde lichtmikroskopisch durch Auszählung ermittelt. In Abb. 3.7 B wurde das Ergebnis der Auszählung einer repräsentativen Schwann-Zell-Kultur grafisch dargestellt. Es wurden hier in 15 Sichtfeldern insgesamt 468 Zellen gezählt, von denen 415 als Schwann-Zellen erkannt wurden. Der prozentuale Anteil an Schwann-Zellen betrug in dieser Kultur 88,7 %, womit diese Kultur das Selektionskriterium erfüllte.

Für weitere Versuche wurden nur Primärkulturen als 'reine Schwann-Zell-Kulturen' eingesetzt, die mindestens zu 80 % aus Schwann-Zellen bestanden. Dieses Kriterium erfüllten ca. 50 % der Kulturen.

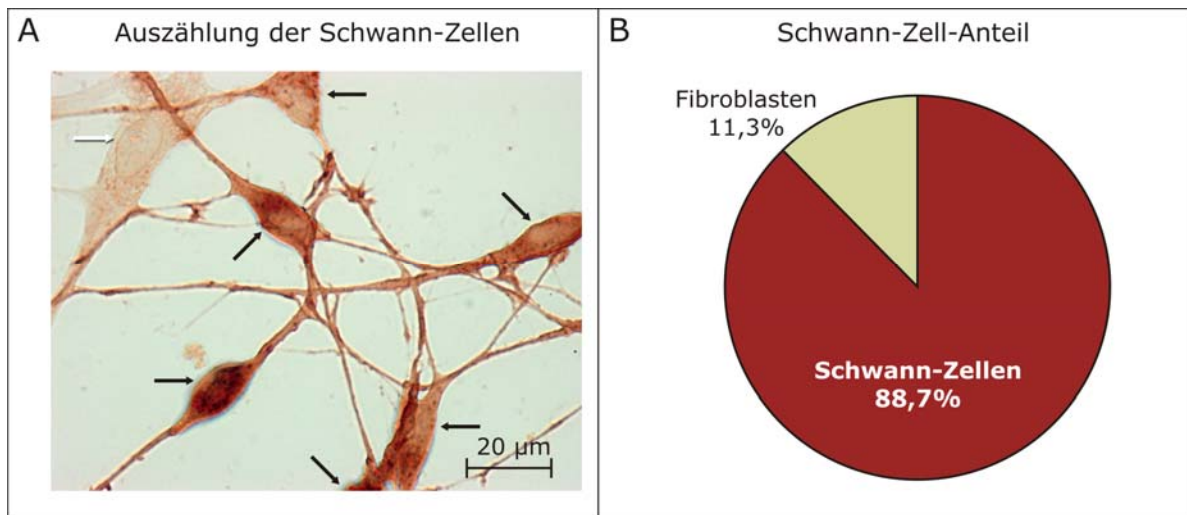


Abb. 3.7: Immunzytochemische Phänotypisierung einer repräsentativen $p75^{\text{LNGFR}}$ / DAB-gefärbten Schwann-Zell-Kultur. Schwann-Zellen wurden auf PDL-beschichteten Deckgläsern für 24 Stunden kultiviert und mit Azeton fixiert. Der Rezeptornachweis erfolgte mit dem Primärantikörper anti $p75^{\text{LNGFR}}$, dessen Bindung Enzym-Substrat-spezifisch mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und dem Chromogen DAB detektiert wurde. Von dieser repräsentativen Schwann-Zell-Kultur wurden von 3 Deckgläsern insgesamt 15 Sichtfelder ausgezählt. Es wurden insgesamt 468 Zellen gezählt, von denen 415 als Schwann-Zellen identifiziert wurden. **A:** Die schwarzen Pfeile zeigen auf sechs DAB-gefärbte Schwann-Zellen, während der weiße Pfeil auf einen ungefärbten Fibroblasten zeigt. Zur Veranschaulichung wurde dieser Ausschnitt mit einer höheren Vergrößerung fotografiert als der, welcher für eine Auszählung verwendet wurde. **B:** Es wurden von drei Deckgläsern jeweils fünf Sichtfelder mit nahezu einzeln liegenden Zellen ausgezählt, summiert und daraus der prozentuale Schwann-Zell-Anteil ermittelt, welcher in dieser repräsentativen Schwann-Zell-Kultur 88,67 % betrug.

3.1.1.3 Durchflusszytometrische Phänotypisierung der Schwann-Zell-Kulturen

Als weitere Methode zur Phänotypisierung der primären Schwann-Zell-Kulturen wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt, um z. B. eine Primärkultur unmittelbar vor einem Versuchsansatz zu phänotypisieren. Dafür wurde aus einem geringen Teil der bereits abgelösten Zellen der prozentuale Anteil von Schwann-Zellen und Fibroblasten mittels FACS-Analyse aufgrund der Expression bestimmter Oberflächenmarker bestimmt: Schwann-Zellen exprimieren den $p75^{\text{LNGF}}$ -Rezeptor, Fibroblasten hingegen lassen sich durch Färbung ihres Zelloberflächenproteins 'Thy-1-Rezeptor' detektieren. Für die Phänotypisierung wurden die abgelösten Zellen mit $p75^{\text{LNGFR}}$ - und Thy-1-spezifischen Primärantikörpern inkubiert, deren Bindung nachfolgend mit einem Cy3-markierten Sekundärantikörper im Durchflusszytometer detektiert wurde.

Die Ergebnisse wurden in einem Punktwolkendiagramm (Dot-Plot) grafisch dargestellt (Abb. 3.8 A-D), wobei in die Auswertung ausschließlich lebende Zellen einbezogen wurden. Die Abgrenzung der lebenden Zellpopulation erfolgte an einer

unbehandelten Zellprobe anhand der Größe und Granularität der zu untersuchenden Zellen (Abb. 3.8 A). In allen weiteren Proben wurden jeweils 100 000 Zellen, die sich innerhalb dieser Grenze befanden, analysiert (Abb. 3.8 B-D). Zur Abgrenzung der nicht-positiv gefärbten Zellen wurde in einer Zell-Probe, die nur mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert wurde, die Fluoreszenzintensität der unspezifischen Bindung gemessen. Dieser Messwert stellte für die nachfolgenden Messungen die Grenzlinie zwischen den positiv detektierten (oberer Sektor) oder negativ detektierten (unterer Sektor) Zellen dar (Abb. 3.8 B). Die Darstellungen (Abb. 3.8 C und 3.8 D) zeigen die Verteilung von Schwann-Zellen und Fibroblasten in einer repräsentativen, 'reinen Schwann-Zell-Kultur'. Der prozentuale Anteil an p75^{LNGF}-Rezeptor-positiven Zellen im oberen Sektor der Abbildung 3.8 C betrug in dieser Kultur 88,3 % gegenüber 11,7 % p75^{LNGF}-Rezeptor-negativer Zellen. Das heißt, diese Kultur bestand zu 88,3 % aus Schwann-Zellen. Von den 11,7 % der p75^{LNGF}-Rezeptor-negativen Zellen exprimierten 7,9 % den Thy-1-Rezeptor (Abb. 3.8 D, oberer Sektor) und konnten somit als Fibroblasten detektiert werden. Ungefähr 50 % der phänotypisierten Schwann-Zell-Kulturen zeigten dieses repräsentative Ergebnis mit einem Schwann-Zell-Anteil von 80 - 90 % und weniger als 20 % Fibroblasten. Diese Kulturen erfüllten das Selektionskriterium und wurden für anschließende Versuchsansätze als 'reine Schwann-Zell-Kulturen' weiter eingesetzt.

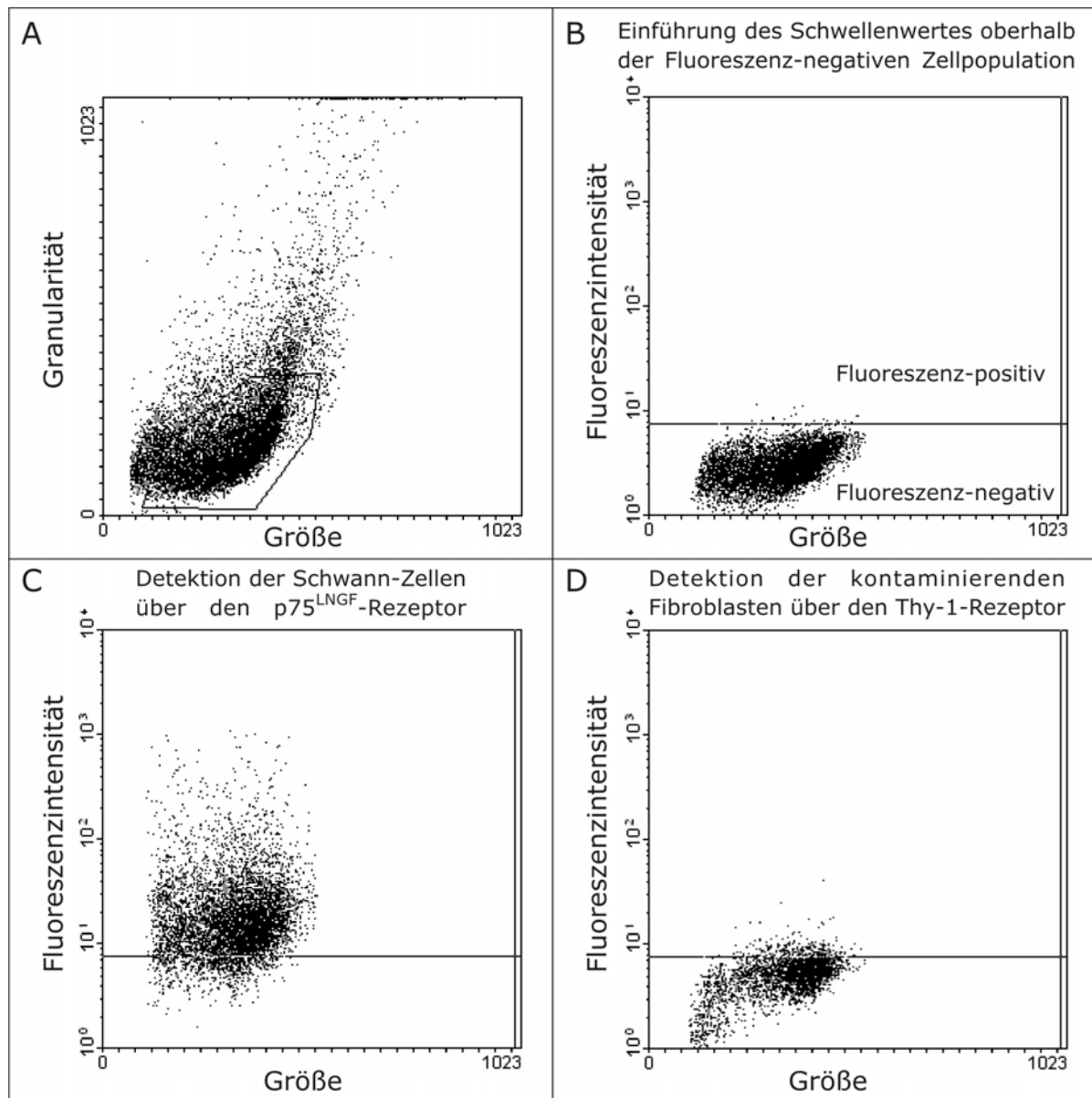


Abb. 3.8: Durchflusszytometrische Charakterisierung einer repräsentativen Schwann-Zell-Kultur. Primäre Schwann-Zellen wurden mit einem Primärantikörper gegen den $p75^{LNGF}$ -Rezeptor (anti- $p75^{LNGFR}$) und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper zur Darstellung der Schwann-Zellen sowie mit einem Antikörper gegen das Oberflächenmolekül Thy-1 (anti Thy-1-Rezeptor) und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper zur Darstellung der kontaminierenden Fibroblasten gefärbt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. **A:** Abgrenzung der lebenden Zellpopulation. **B:** Darstellung der fluoreszenz-negativen Zellpopulation. **C:** Darstellung der Schwann-Zellen (88,3%) im oberen Sektor. **D:** Darstellung der Fibroblasten (7,9 %) im oberen Sektor.

3.2 Ang II–Rezeptoren auf Schwann-Zellen

Um der Fragestellung nachzugehen, ob Ang II eine axonale Regeneration möglicherweise durch Beeinflussung der Funktion von Schwann-Zellen fördert, war es notwendig, zunächst das Vorhandensein von Ang II-Rezeptoren auf Schwann-Zellen zu untersuchen.

3.2.1 Nachweis der Expression von AT_{1a}- und AT₂-Rezeptor-mRNA in Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen sowie in Spinalganglien-Fibroblasten mittels RT-PCR

Der qualitative Nachweis von mRNA-Transkripten der Ang II-Rezeptoren (AT_{1a}- und AT₂-Rezeptoren) in Schwannoma-Zellen und in primären Schwann-Zellen sowie in Spinalganglien-Fibroblasten als Vergleichszellen wurde mit Hilfe der RT-PCR erbracht. Die dafür verwendeten spezifischen Primer sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

In primären Schwann-Zellen und in Spinalganglien-Fibroblasten konnten spezifische Banden sowohl für den AT_{1a}-Rezeptor (394 bp) (Abb. 3.9 A) als auch für den AT₂-Rezeptor (222 bp) (Abb. 3.9 C) nachgewiesen werden. Auch in den Schwannoma-Zellen konnte der AT_{1a}-Rezeptor eindeutig detektiert werden (171 bp) (Abb. 3.9 B), jedoch war in den Schwannoma-Zellen neben einer spezifischen Bande für den AT₂-Rezeptor (253 bp) eine weitere schwache unspezifische Bande außerhalb dieser Größenordnung zu identifizieren (Abb. 3.9 D). Keine der untersuchten Zellarten wies, trotz des Einsatzes verschiedener Primer, eine eindeutige Bande für den AT_{1b}-Rezeptor auf (ohne Abb.). Die verschiedenen Größen für die Ang II-Rezeptorsubtypen in primären Schwann-Zellen und Schwannoma-Zellen kommen durch den Spezies-Unterschied zustande. Die primären Schwann-Zellen sind Zellen aus der Ratte und die Schwannoma-Zellen sind Zellen aus der Maus.

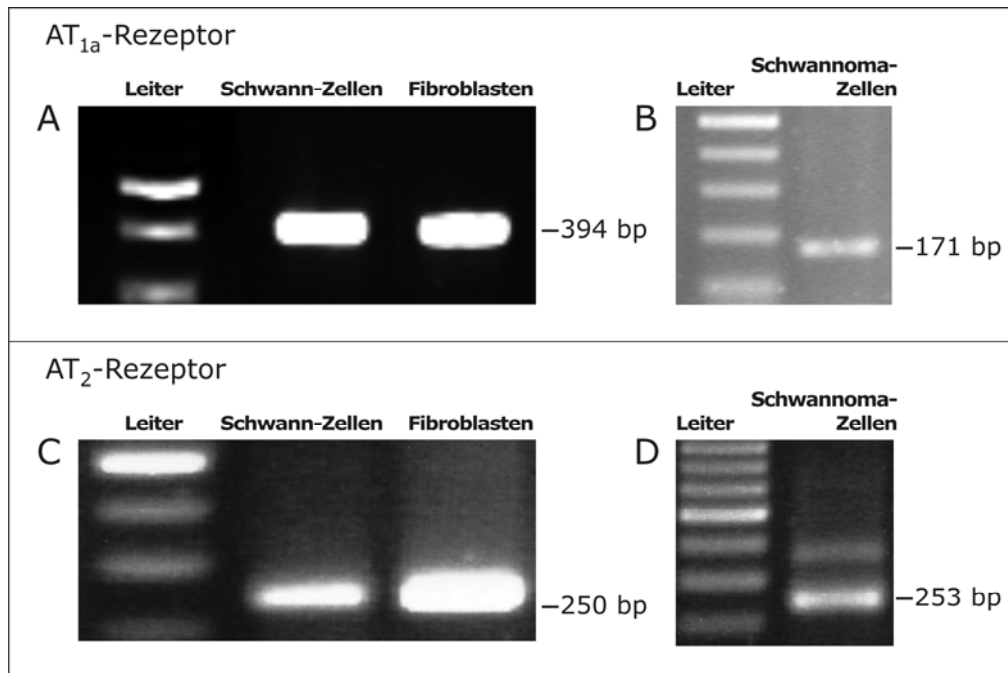


Abb. 3.9: Expression von mRNA-Transkripten des AT_{1a}- und AT₂-Rezeptors in primären Schwann-Zellen und Schwannoma-Zellen sowie in Spinalganglien-Fibroblasten. Die RNA unbehandelter Zellen wurde aus den Kulturen isoliert, revers transkribiert und in einer RT-PCR mit spezifischen Primern für den AT_{1a}-Rezeptor (**A**: 394 bp) und (**B**: 171 bp), den AT₂-Rezeptor (**C**: 250 bp) und (**D**: 253 bp) oder GAPDH (**ohne Abb.:** 387 bp) bzw. Beta-Actin (**ohne Abb.:** 281 bp) als interne PCR-Kontrolle eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 2 %igen Agarose-Gel getrennt und nach einer Ethidiumbromid-Behandlung unter UV-Licht anhand eines Standards (100 bp Leiter) detektiert. Die intensivere Bande der Leiter repräsentiert jeweils die 500 bp-Marke.

3.2.2 Nachweis der AT₁- und AT₂-Rezeptoren auf Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen

Im Anschluss an den Nachweis der mRNA für die AT₁- und AT₂-Rezeptoren mittels RT-PCR sollte auf Protein-Ebene das Vorhandensein der AT₁- und AT₂-Rezeptorproteine mittels indirekter Immunfluoreszenz auf der Zelloberfläche von Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen gezeigt werden. Der Rezeptornachweis erfolgte mit Rezeptor-spezifischen AT₁- und AT₂-Rezeptor-Antikörpern, deren Bindung mit einem rot fluoreszierenden Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper markiert wurde. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid gegengefärbt und fluoreszierten blau.

3.2.2.1 AT₁- und AT₂-Rezeptoren auf Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen

AT₁- und AT₂-Rezeptoren wurden auf der Zelloberfläche von Schwannoma-Zellen und von primären Schwann-Zellen nachgewiesen (Abb. 3.10). Anhand der Kontrollfärbung, bei der nur die Zellkerne blau fluoreszierten, die Zellkörper jedoch

ungefärbt blieben, konnte eine unspezifische Bindung des rot fluoreszierenden Cy3-markierten Sekundärantikörpers ausgeschlossen werden (C+F). Dahingegen fluoreszierten die Cy3-markierten AT_1 - und AT_2 -Rezeptoren sowohl auf den Schwannoma-Zellen (B+C) als auch auf den primären Schwann-Zellen (D+E) punktuell rot.

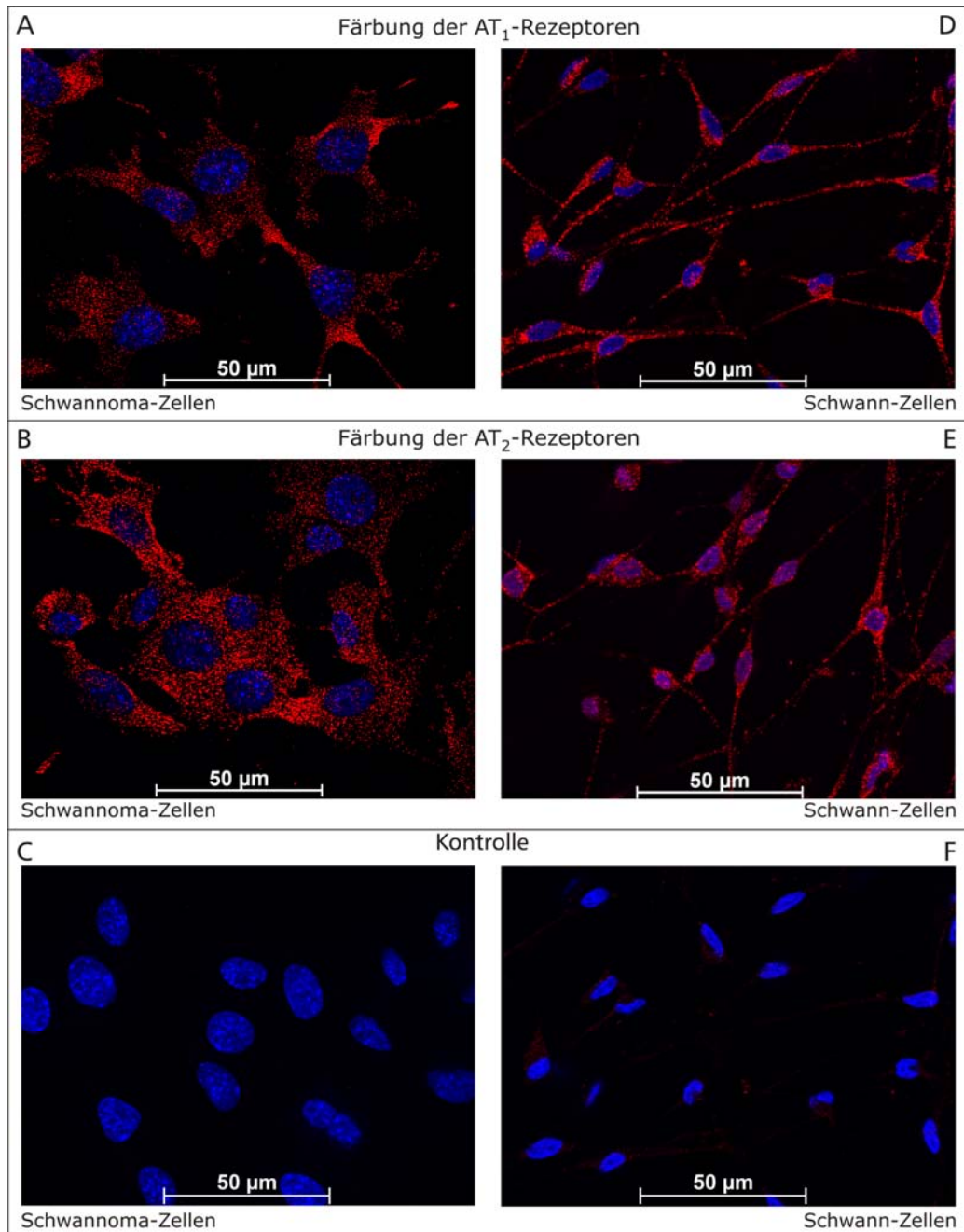


Abb. 3.10: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der AT_1 - und AT_2 -Rezeptoren auf Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen. Schwannoma-Zellen und primäre Schwann-Zellen wurden auf PDL-beschichteten Deckgläsern für 24 Stunden kultiviert und mit einer Zamboni-Fixierlösung fixiert. Der Rezeptornachweis erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz mit den Primärantikörpern: anti AT_1 - und anti AT_2 -Rezeptor. Die Detektion gebundener Primärantikörper erfolgte durch einen rot fluoreszierenden Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (anti Kaninchen-IgG-Cy3). Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid gegengefärbt und fluoreszierten blau. Abb. **A** und **D** zeigen die rot fluoreszierenden AT_1 -Rezeptoren, Abb. **B** und **E** zeigen die rot fluoreszierenden AT_2 -Rezeptoren. Abb. **C** und **F** zeigen die jeweiligen Kontrollfärbungen.

3.3 Einfluss von Ang II auf Schwannoma-Zellen und primäre Schwann-Zellen

Da die Untersuchungen an primären Schwann-Zellen und Schwannoma-Zellen (RT-PCR und Immunfärbungen) den Nachweis der Ang II-Rezeptorexpression erbrachten, sollte in nachfolgenden Experimenten geprüft werden, welchen Einfluss die Gabe von Ang II auf Schwann-Zellen hat. Für die Untersuchungen der Zellmodulation durch Ang II wurden entweder Schwannoma-Zell-Kulturen und / oder Kulturen aus primären Schwann-Zellen mit Ang II stimuliert und anschließend der Einfluss von Ang II auf die Zellen analysiert. Bei einigen Versuchen wurden zusätzlich Vergleichszellkulturen aus Spinalganglien-Fibroblasten oder Co-Kulturen eingesetzt.

3.3.1 Einfluss von Ang II auf die AT_{1a}- und AT₂-Rezeptor-mRNA

Eine mögliche Beeinflussung der AT_{1a}- und AT₂-Rezeptor-mRNA-Expression durch Ang II selbst wurde mittels *realtime*-RT-PCR untersucht. In einem weiteren Ansatz wurde die Hypothese untersucht, ob Ang II bei oxidativen Stress die Expression dieser Rezeptoren verändert. Die Untersuchungen wurden an primären Schwann-Zellen und vergleichend dazu an Spinalganglien-Fibroblasten und an Co-Kulturen, bestehend aus Spinalganglien-Fibroblasten und Schwannoma-Zellen, durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte an Zellen, die für 24 Stunden mit 1 µM Ang II, mit 1 µM H₂O₂ als oxidativem Stressor oder der Kombination aus 1 µM Ang II und 1 µM H₂O₂ stimuliert worden waren. Mit Hilfe Spezies- und Rezeptor-spezifischer TaqMan[®]-Sonden (Tab. 2.2) wurde anhand der relativen Expression des nichtregulierten 'Housekeeping Gens' GAPDH (Tab. 2.2) die AT_{1a}- und AT₂-Rezeptorexpression quantifiziert. Die Ergebnisse der stimulierten Proben wurden auf die unbehandelte Kontrollprobe bezogen und die Ratio mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde die Kontrolle gleich 1 gesetzt.

3.3.1.1 Ang II regulierte die Expression der AT_{1a}- und AT₂-Rezeptor-mRNA in primären Schwann-Zellen herab

In den Schwann-Zellen war nach einer 24-stündigen Stimulation mit Ang II die mRNA-Expression der AT_{1a}-Rezeptoren im Vergleich zu Kontrolle signifikant auf das 0,6-fache \pm 0,06 und die mRNA-Expression der AT₂-Rezeptoren signifikant auf das 0,4-fache \pm 0,15 verringert. Auch die kombinierte Behandlung mit Ang II und H₂O₂ reduzierte die Expression der AT_{1a}-Rezeptor-mRNA signifikant auf das 0,6-fache \pm 0,07. Oxidativer Stress führte tendenziell zu einer Abnahme der mRNA-Expression beider Rezeptor-Typen, ebenso führte eine kombinierte Ang II / H₂O₂-Stimulation tendenziell zu einer verringerten Expression der AT₂-Rezeptor-mRNA (Abb. 3.11).

In oxidativ gestressten Zellen wurde die mRNA-Expression beider Rezeptortypen nach Zugabe von Ang II ebenfalls tendenziell reduziert: die AT_{1a}-Rezeptor-mRNA vom 0,9-fachen \pm 0,10 auf das 0,6-fache \pm 0,07 und die AT₂-Rezeptor-mRNA vom 0,7-fachen \pm 0,12 auf das 0,5-fache \pm 0,10 (Abb. 3.11).

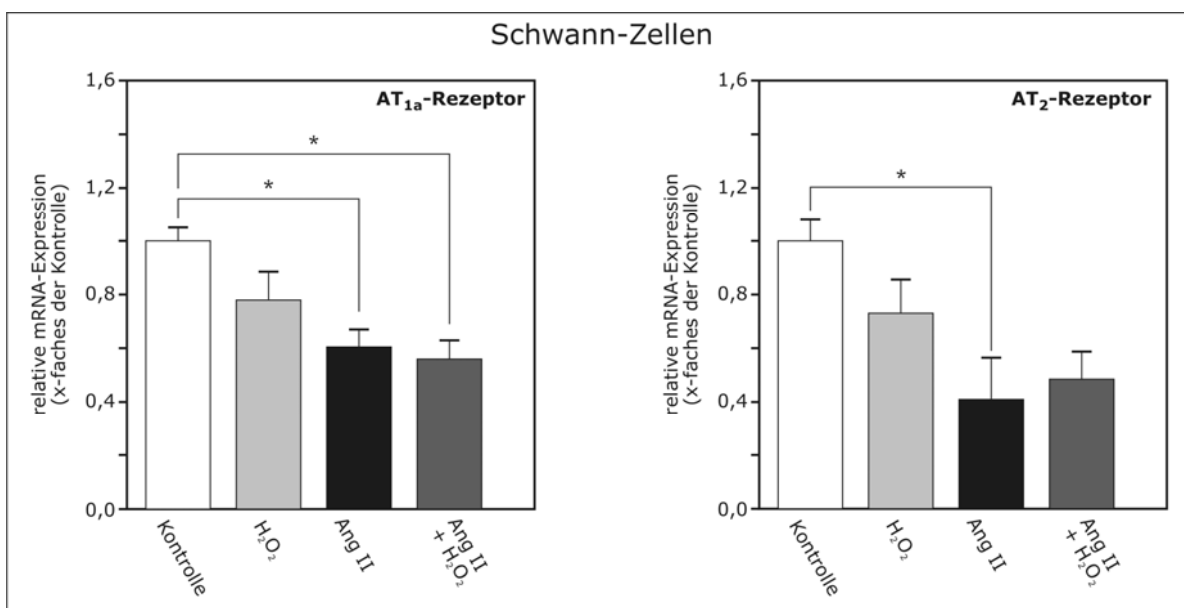


Abb. 3.11: Nachweis des Einflusses von Ang II auf die AT_{1a}- und AT₂-Rezeptor-mRNA-Expression in primären Schwann-Zellen mittels *realtime*-RT-PCR. Zur relativen Quantifizierung der AT_{1a}- und AT₂-Rezeptoren wurden primäre Schwann-Zellen mit 1 μ M H₂O₂, 1 μ M Ang II und der Kombination aus beiden stimuliert. Aus den Zellen wurde RNA isoliert, revers transkribiert und je Probe 10 ng cDNA in der *realtime*-RT-PCR eingesetzt. Mit Hilfe Ratten-spezifischer TaqMan[®]-Sonden für den AT_{1a}- und den AT₂-Rezeptor wurde die relative Expression der Rezeptor-mRNA analysiert. Sowohl die mRNA-Expression des AT_{1a}-Rezeptors als auch des AT₂-Rezeptors wurde durch Ang II signifikant reduziert, auch eine kombinierte Ang II / H₂O₂-Stimulation verringerte die Expression der Rezeptor-mRNA für den AT_{1a}-Rezeptor signifikant. Oxidativer Stress führte der Tendenz nach zu einer reduzierten mRNA-Expression beider Rezeptor-Typen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SEM (n = 9, ANOVA_{AT1a-Rezeptor}: p = 0,0094, ANOVA_{AT2-Rezeptor}: p = 0,0235, Vergleich der Messgruppen nach Bonferroni: *p < 0,05).

3.3.1.2 Ang II hatte in Spinalganglien-Fibroblasten keinen Einfluss auf die Expression der AT_{1a}- und AT₂-Rezeptor-mRNA

Um den Einfluss von Ang II auch auf Fibroblasten, dem *in vivo* mit Schwann-Zellen eng assoziierten Zelltyp, zu untersuchen, wurde die AT_{1a}- und AT₂-Rezeptorexpression ebenfalls in Spinalganglien-Fibroblasten relativ quantifiziert. In den Spinalganglien-Fibroblasten wurde nach einer 24-stündigen Stimulation mit Ang II, H₂O₂ oder der Kombination aus beiden keine signifikante Beeinflussung der mRNA-Expression des AT_{1a}-Rezeptors und des AT₂ Rezeptors in Bezug zur Kontrolle analysiert. Lediglich eine kombinierte Behandlung mit Ang II und H₂O₂ schien tendenziell die mRNA-Expression des AT₂-Rezeptors auf das 1,4-fache \pm 0,16 zu erhöhen (Abb. 3.12).

Nach Zugabe von Ang II wurde in oxidativ gestressten Zellen die mRNA-Expression des AT_{1a}-Rezeptors tendenziell vom 0,76-fachen \pm 0,14 auf das 1,03-fache \pm 0,12 erhöht und die des AT₂-Rezeptors vom 1,4-fachen \pm 0,16 auf das 1,09-fache \pm 0,16 reduziert (Abb. 3.12).

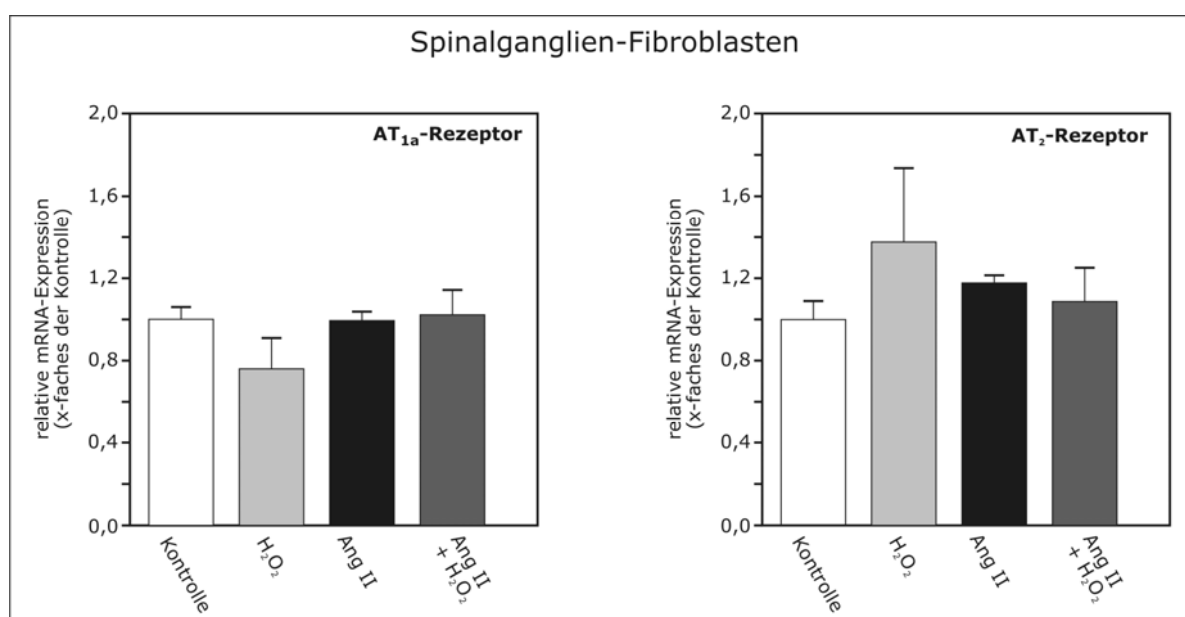


Abb. 3.12: Untersuchung zum Einfluss von Ang II auf die mRNA-Expression des AT_{1a}- und des AT₂-Rezeptors in Spinalganglien-Fibroblasten mittels *realtime*-RT-PCR. Zur relativen Quantifizierung der AT_{1a}- und AT₂-Rezeptoren wurden Spinalganglien-Fibroblasten mit 1 μ M H₂O₂, 1 μ M Ang II und der Kombination aus beiden stimuliert. Aus den Zellen wurde RNA isoliert, *revers* transkribiert und je Probe 10 ng cDNA in der *realtime*-RT-PCR eingesetzt, um mit Ratten-spezifischen AT_{1a}- und AT₂-TaqMan[®]-Sonden die relative Expression der Rezeptor-mRNA zu analysieren. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SEM (n = 9, ANOVA_{AT1a-Rezeptor}: p = 0,251, ANOVA_{AT2-Rezeptor}: p = 0,581).

3.3.1.3 Ang II regulierte in Schwannoma-Zellen aus Co-Kulturen die Expression der AT₂-Rezeptor-mRNA leicht herab

Der Einfluss von Ang II auf die Expression von AT_{1a}- und AT₂-Rezeptor-mRNA wurde auch in Co-Kulturen aus Spinalganglien-Fibroblasten und Schwannoma-Zellen untersucht. Die Rezeptorexpression wurde ausschließlich in den Schwannoma-Zellen nach einer 24-stündigen Stimulation relativ quantifiziert.

In den Schwannoma-Zellen der Co-Kulturen wurde nach einer Stimulation mit Ang II, H₂O₂ oder der Kombination aus beiden keine signifikante Beeinflussung der mRNA-Expression des AT_{1a}-Rezeptors und des AT₂-Rezeptors in Bezug zur Kontrolle ermittelt. Lediglich auf die mRNA-Expression des AT₂ Rezeptors schienen sowohl Ang II als auch oxidativer Stress eine deutliche, aber im Gruppenvergleich nach Bonferroni nicht signifikante, reduzierende Wirkung auszuüben. So verringerte Ang II die Expression der AT₂-Rezeptor-mRNA auf das 0,34-fache ± 0,22, und oxidativer Stress reduzierte diese auf das 0,3-fache ± 0,2 (Abb. 3.13). In oxidativ gestressten Zellen wurde nach Zugabe von Ang II die mRNA-Expression beider Rezeptortypen nach Ang II-Gabe der Tendenz nach heraufreguliert: die AT_{1a}-Rezeptor-mRNA vom 0,75-fachen ± 0,15 auf das 1,04-fache ± 0,13 und die AT₂-Rezeptor-mRNA vom 0,3-fachen ± 0,20 auf das 0,81-fache ± 0,29 (Abb. 3.13).

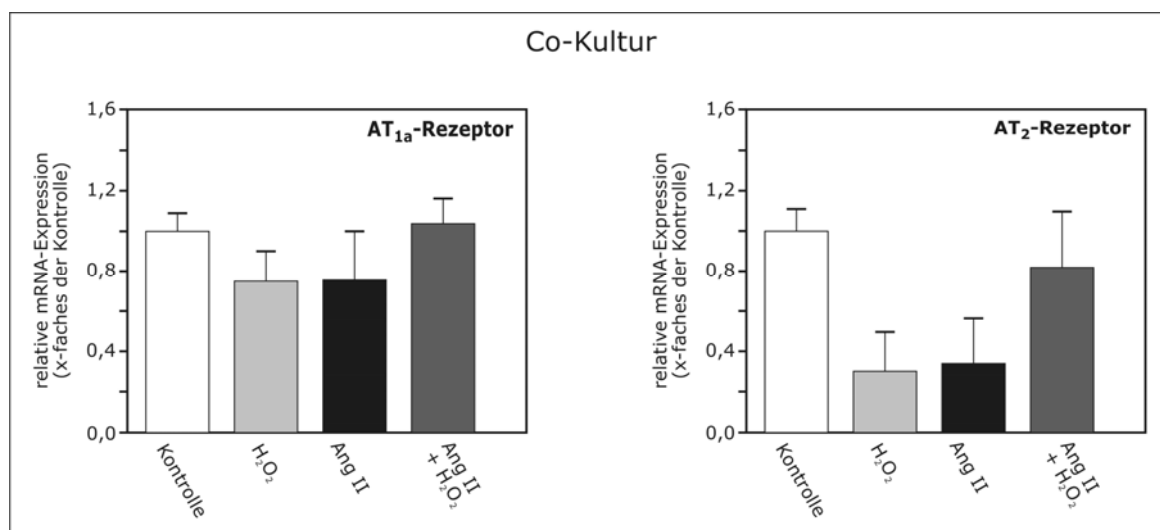


Abb. 3.13: Untersuchung zum Einfluss von Ang II auf die Expression von AT_{1a}- und AT₂-Rezeptor-mRNA in den Schwannoma-Zellen von Co-Kulturen mittels *realtime*-RT-PCR. Co-Kulturen wurden mit 1 µM H₂O₂, 1 µM Ang II und der Kombination aus beiden stimuliert. Aus den Zellen wurde RNA isoliert, revers transkribiert und je Probe 10 ng cDNA in der *realtime*-RT-PCR eingesetzt, um mit mausspezifischen AT_{1a}- und AT₂-TaqMan[®]-Sonden die relative Expression der AT_{1a}- und AT₂-Rezeptoren in den Schwannoma-Zellen zu quantifizieren. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SEM (n = 6, ANOVA_{AT1a-Rezeptor}: p = 0,33, ANOVA_{AT2-Rezeptor}: p = 0,049).

3.3.2 Einfluss von Ang II auf die Synthese der AT₁- und AT₂-Rezeptor-Proteine in primären Schwann-Zellen

Eine mögliche Beeinflussung der AT₁- und AT₂-Rezeptorprotein-Synthese in primären Schwann-Zellen durch Ang II sowie die gemeinsame Wirkung von Ang II und dem oxidativen Stressor H₂O₂ auf diese Rezeptoren wurden mittels Western Blot-Analysen untersucht.

3.3.2.1 Ang II regulierte die Synthese der AT₁-Rezeptor-Proteine herauf und die Synthese der AT₂-Rezeptor-Proteine herab

Die zu untersuchenden primären Schwann-Zellen wurden für 24 Stunden mit 1 µM Ang II, mit 1 µM H₂O₂ sowie mit der Kombination aus beiden stimuliert. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die anschließend aus den primären Schwann-Zellen isolierten Gesamtproteine wurden mittels Western-Blot analysiert.

Sowohl die Protein-Bande des AT₁-Rezeptors (Abb. 3.14 A) als auch die des AT₂-Rezeptors (Abb. 3.14 B) wurden mit einem erwarteten Molekulargewicht von 50 kDA in allen Proben detektiert. Jedoch waren die Bandenintensitäten in den unterschiedlich stimulierten Proben verschieden. Die unstimulierten primären Schwann-Zellen zeigten beim AT₁-Rezeptor eine schwache Protein-Bande, deren Intensität nach jeder hier gezeigten Stimulation zunahm (Abb. 3.14). Die stärkste Bande für den AT₁-Rezeptor zeigte sich nach einer kombinierten Stimulation mit Ang II und H₂O₂. Anders verhielt es sich mit den Intensitäten der Protein-Banden des AT₂-Rezeptors. Hier war in den unstimulierten Zellen die stärkste Bande zu erkennen, während die anderen Stimulanzen eine weitaus geringere Intensität der Protein-Banden bewirkten. Beim Auftragen der Proben wurde besonderer Wert auf das Aufbringen gleicher Proteinmengen (bestimmt nach Bradford) gelegt (Kap. 2.13.1), weshalb dieses Ergebnis auf eine verstärkte Synthese der AT₁-Rezeptor-Proteine und eine verringerte Synthese der AT₂-Rezeptor-Proteine nach einer Behandlung mit Ang II oder H₂O₂ bzw. der Kombination aus den beiden Stimulanzen schließen lässt (Abb. 3.14).

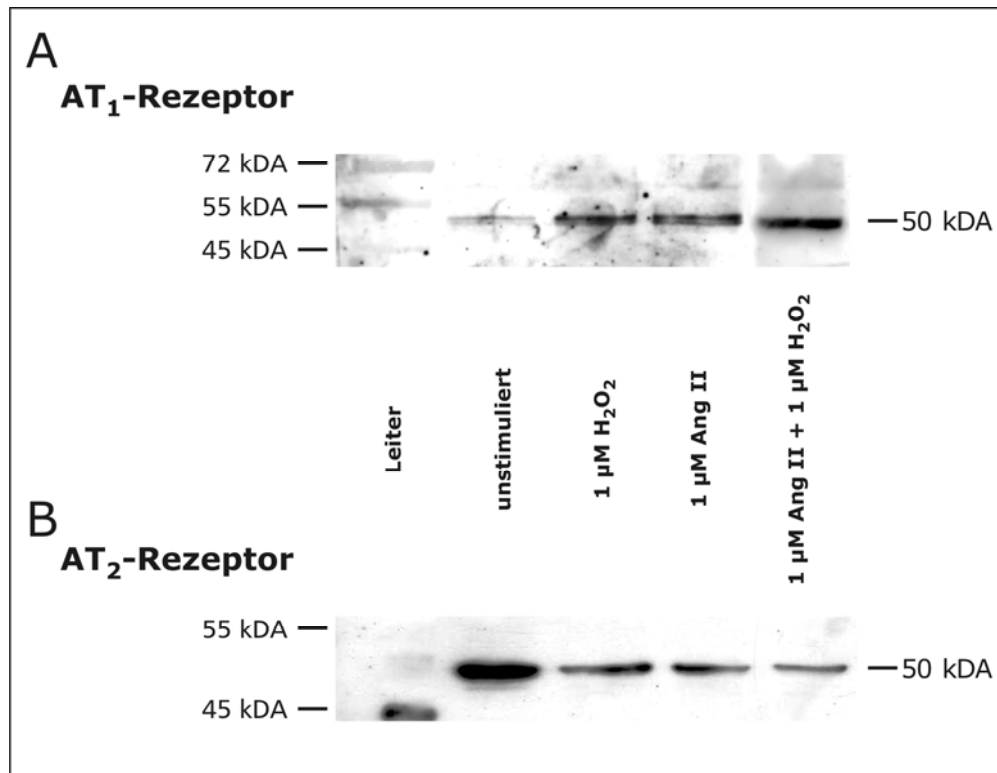


Abb. 3.14: Einfluss von Ang II auf die Synthese der Ang II-Rezeptor-Proteine. Die Ang II-Rezeptor-Protein-Synthese wurde in primären Schwann-Zellen nach einer 24-stündigen Stimulation mit Ang II, H₂O₂ oder der Kombination aus beiden mittels Western-Blot analysiert. Die Kontrollzellen blieben unstimuliert. Vergleichende Aussagen über die jeweilige Rezeptor-Protein-Synthese erfolgte aufgrund der Bandenintensitäten. Dabei wurde besonderer Wert auf das Auftragen gleicher Proteinmengen (bestimmt nach Bradford) gelegt. Es ließ sich eine deutliche Zunahme der Bandenintensität aller stimulierten Zellen gegenüber den Kontrollzellen bei der Analyse der AT₁-Rezeptor-Protein-Synthese beobachten (**A**). Genau entgegengesetzt verhielt es sich mit der Synthese der Proteine für den AT₂-Rezeptor (**B**). Hier nahm die Intensität der Protein-Banden nach einer Stimulation der Zellen stark ab, während in den unstimulierten Kontrollzellen eine starke Synthese der AT₂-Rezeptor-Proteine stattzufinden schien.

3.4. Ang II-Rezeptor-vermittelter Einfluss von Ang II auf Schwannoma-Zellen

3.4.1 Ang II förderte die Translokation von NF-κB in den Zellkern

Eine durch Ang II-Gabe initiierte Signaltransduktion in Schwann-Zellen kann über den Transkriptionsfaktor NF-κB laufen, da Ang II über AT₁- und AT₂-Rezeptoren NF-κB aktivieren kann.

Um eine mögliche NF-κB-Aktivierung durch Ang II zu untersuchen, wurden Schwannoma-Zellen mit Ang II stimuliert und die Lokalisation von NF-κB mittels Immunfärbung ermittelt. Sowohl in den Kontrollzellen (Abb. 3.15 A) als auch in den Ang II-stimulierten Zellen (Abb. 3.15. B) zeigte sich eine starke NF-κB-

Immunreaktivität (grün fluoreszierend). Auffallend war jedoch, dass NF- κ B in den unstimulierten Kontrollzellen fast ausschließlich im Zytoplasma zu finden war (Abb. 3.15 A), während in den Ang II-stimulierten Zellen große Mengen von NF- κ B in den Zellkernen zur Aktivierung von Genen lokalisiert waren (Abb. 3.15 B).

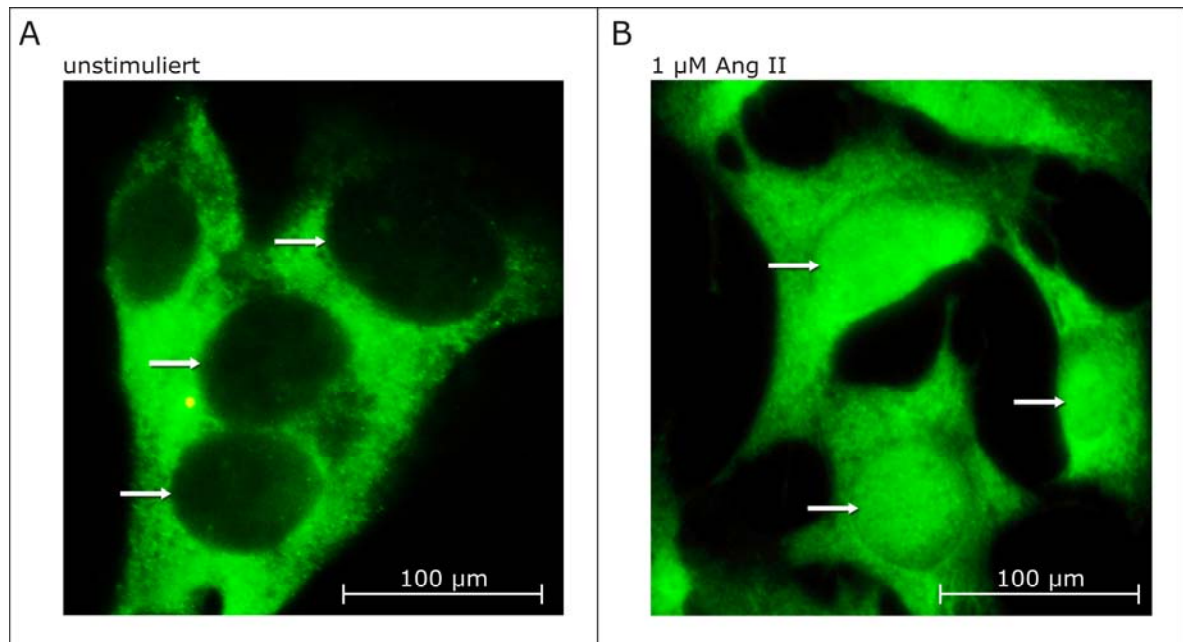


Abb. 3.15: In Ang II-stimulierten Schwannoma-Zellen wurde der Transkriptionsfaktor NF- κ B vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert. 24 Stunden auf Deckgläsern gewachsene Schwannoma-Zellen wurden für 1 Stunde mit 1 μ M Ang II stimuliert und dann azetonfixiert. Die Detektion von NF- κ B erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem Primärantikörper gegen die 65 kD-Untereinheit von NF- κ B (anti NF- κ B-p65), dessen Bindung- und damit die Lokalisation von NF- κ B- mit einem biotinylierten anti Kaninchen-IgG und der nachfolgenden Zugabe von grün fluoreszierendem Avidin-gebundenem FITC gezeigt wurde (A und B). Dargestellt wurde ein repräsentatives Ergebnis von mehreren unabhängigen Experimenten. Die Pfeile weisen auf die Zellkerne.

Um anschließend zu klären, über welchen Ang II-Rezeptor die NF- κ B-Translokation vermittelt wurde, erfolgten Versuche mit den spezifischen Rezeptor-Antagonisten Losartan (AT₁-Rezeptor-Antagonist) und PD 123319 (AT₂-Rezeptor-Antagonist). Die Zellen wurden für eine Stunde mit 1 μ M Ang II oder 10 μ M Losartan oder 10 μ M PD123319 oder den Kombinationen aus 1 μ M Ang II und 10 μ M Losartan bzw. 1 μ M Ang II und 10 μ M PD123319 stimuliert. Nach Beendigung der Stimulationen wurden mittels EMSA die Kernproteine der Zellen analysiert.

Im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen zeigten die mit Ang II-behandelten Schwannoma-Zellen eine intensivere NF- κ B-Bande, die in Anwesenheit des AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan noch verstärkt wurde. Die anderen Versuchsgruppen zeigten, verglichen mit der Kontrolle, keinen Einfluss auf die

Menge an NF- κ B in den Kernproteinen (Abb. 3.16). Somit zeigte sich auch in diesem zusätzlichen Versuchsansatz, dass Ang II eine Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B vom Zytoplasma in den Zellkern von Schwannoma-Zellen initiieren kann und, dass eine Blockierung des AT₁-Rezeptors durch den AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan während der Ang II-Stimulation diesen Effekt verstärkt.

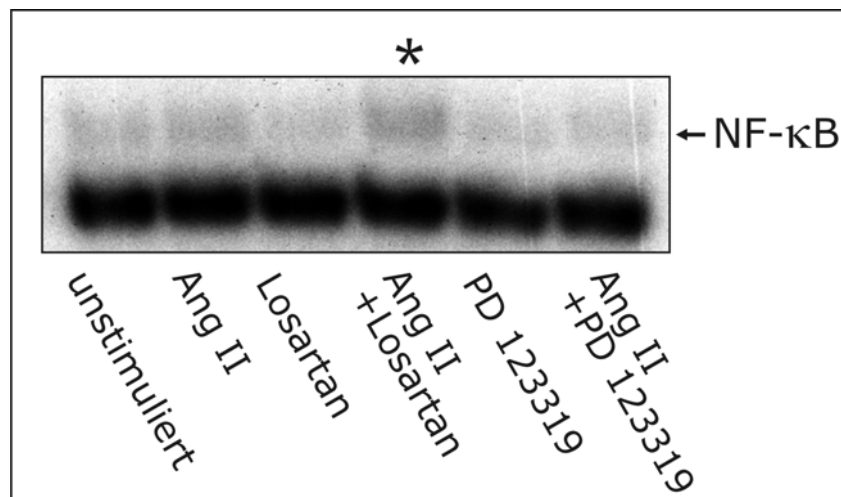


Abb. 3.16: Effekt von Ang II auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Die Kernproteine von unstimulierten Schwannoma-Zellen und von Schwannoma-Zellen, die für eine Stunde mit Ang II allein, mit Losartan allein, mit der Kombination aus Losartan und Ang II, mit PD123319 allein sowie mit der Kombination aus PD123319 und Ang II stimuliert wurden, wurden isoliert und mit spezifischen Sonden für NF- κ B mittels EMSA analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von 4 unabhängigen Experimenten. Quantitativ am meisten NF- κ B wurde in den Kernproteinen der kombiniert mit Ang II und Losartan-behandelten Schwannoma-Zellen (*) detektiert, gefolgt von den allein mit Ang II-stimulierten Schwannoma-Zellen, was an der Bandenintensität ersichtlich ist.

3.4.2 Einflussnahme von Ang II auf die Zellproliferation

Ein weiterer wichtiger Parameter zur funktionellen Rekonstruktion verletzter Nervenbahnen ist die Proliferationsfähigkeit von Schwann-Zellen.

Zur vergleichenden Untersuchung der Einflussnahme von Ang II auf das Proliferationsverhalten von Schwann-Zellen, Spinalganglien-Fibroblasten und Co-Kulturen wurden die Zellen für 24 Stunden mit 1 μ M Ang II, 1 μ M H₂O₂ und der Kombination aus beiden stimuliert. Die Proliferationsrate wurde über den ³H-Thymidin-Einbau der Zellen bestimmt.

3.4.2.1 Ang II wirkte proliferationsfördernd auf primäre Schwann-Zellen

In den Schwann-Zellen führten alle Stimulationen zu einem Anstieg des ^3H -Thymidin-Einbaues und damit zu einer Steigerung der Proliferationsrate (Abb. 3.17), wobei die Stimulation mit Ang II zu einer signifikanten Proliferationserhöhung um den Faktor $3,2 \pm 0,57$ von durchschnittlich 3832 cpm auf 12290 cpm führte. Durch Inkubation der Schwann-Zellen mit dem oxidativen Stressauslöser H_2O_2 allein wurde die Proliferationsrate tendenziell den Faktor $1,7 \pm 0,11$ von durchschnittlich 3832 cpm auf durchschnittlich 6346 cpm gesteigert, und die kombinierte Behandlung mit Ang II und H_2O_2 reduzierte den Ang II-Effekt tendenziell um den Faktor $1,8 \pm 0,14$ von durchschnittlich 12290 cpm auf durchschnittlich 6706 cpm. Aufgrund dieser Ergebnisse ließ sich feststellen, dass Ang II auf Schwann-Zellen eine starke proliferationsfördernde Wirkung ausübt. Oxidativ gestresste Schwann-Zellen sowie oxidativ gestresste Schwann-Zellen in Anwesenheit von Ang II, zeigten gegenüber den allein mit Ang II stimulierten Schwann-Zellen eine signifikant geringere Proliferation, die jedoch gegenüber der Kontrolle tendenziell leicht erhöht war (Abb. 3.17). Auf oxidativ gestresste Schwann-Zellen übte Ang II keinen Einfluss aus.

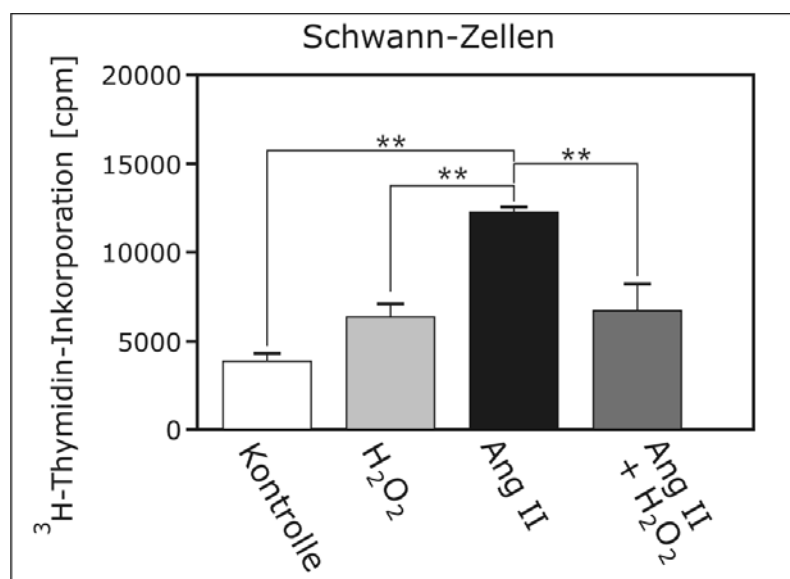


Abb. 3.17: Einfluss von Ang II auf das Proliferationsverhalten von Schwann-Zellen. Schwann-Zellen wurden für 24 Stunden mit $1 \mu\text{M}$ H_2O_2 , $1 \mu\text{M}$ Ang II und der Kombinationen aus jeweils $1 \mu\text{M}$ H_2O_2 und $1 \mu\text{M}$ Ang II für 24 Stunden stimuliert. Nach Zugabe von $1 \text{ mCi} / \text{ml}$ ^3H -Thymidin während der letzten 6 Stunden der Stimulationszeit wurde dessen Einbaurrate in cpm gemessen und als Proliferationsmaß gewertet. Im Vergleich mit den Kontrollzellen führte eine 24-stündige Stimulation der Schwann-Zellen mit Ang II zu einer signifikanten Proliferationserhöhung auf das 3,2-fache $\pm 0,57$ und mit H_2O_2 zu einer Proliferationssteigerung auf das 1,7-fache $\pm 0,11$. Die kombinierte Ang II / H_2O_2 -Behandlung reduzierte den proliferationsfördernden Effekt von Ang II um den Faktor $1,8 \pm 0,14$. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SEM ($n = 9$, ANOVA: $p = 0,0001$, Vergleich der Messgruppen nach Bonferroni: $**p < 0,01$).

3.4.2.2 Ang II hatte keinen Einfluss auf die Proliferation oxidativ gestresster als auch ungestresster Spinalganglien-Fibroblasten

Zum Vergleich wurde auch der Einfluss von Ang II auf das Proliferationsverhalten von Fibroblasten untersucht, da dieser Zelltyp *in vivo* eng mit Schwann-Zellen verbunden ist.

Das Ergebnis zeigt, dass weder Ang II noch H_2O_2 die Spinalganglien-Fibroblasten in ihrem Proliferationsverhalten beeinflussten (Abb. 3.18).

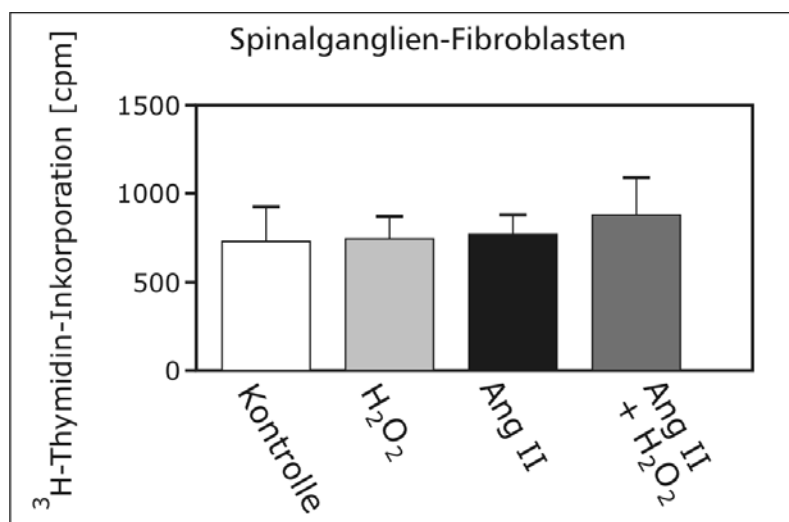


Abb. 3.18: Einfluss von Ang II auf das Proliferationsverhalten von Spinalganglien-Fibroblasten. Spinalganglien-Fibroblasten wurden für 24 Stunden mit $1 \mu M H_2O_2$, $1 \mu M$ Ang II und den Kombinationen aus jeweils $1 \mu M H_2O_2$ und $1 \mu M$ Ang II stimuliert. Nach Zugabe von $1 mCi / ml$ 3H -Thymidin während der letzten 6 Stunden der Stimulationszeit wurde dessen Einbaurrate in cpm gemessen und als Proliferationsmaß gewertet. Im Vergleich zu den Kontrollzellen führte keine der Stimulationen zu einer Änderung des Proliferationsverhaltens. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SEM (n = 9, ANOVA: p = 0,916).

3.4.2.3 Ang II wirkte proliferationsfördernd auf Schwannoma-Zellen in Co-Kulturen

Die Einflussnahme von Fibroblasten auf das Proliferationsverhalten Ang II-stimulierter Schwann-Zellen wurde an Co-Kulturen untersucht. Ähnlich wie bei den primären Schwann-Zellen (Abb. 3.17) bewirkten auch in den Schwannoma-Zellen der Co-Kulturen alle Stimulanzen einen Anstieg des 3H -Thymidin-Einbaues (Abb. 3.19), was mit Zell-Proliferation in Zusammenhang gebracht werden kann. So erhöhte Ang II die Proliferationsrate signifikant auf das 2,8-fache $\pm 0,07$ von durchschnittlich 2803 cpm auf 7945 cpm. Oxidativer Stress hatte keinen Einfluss auf die Proliferation. Durch eine kombinierte Ang II / H_2O_2 -Behandlung wurde die Ang II-induzierte Proliferation signifikant um den Faktor $1,7 \pm 0,5$ gesenkt (von 7945 cpm auf

4556 cpm). Diese Ergebnisse zeigen, dass Ang II auch auf die Co-Kulturen eine starke proliferationsfördernde Wirkung ausübt, während oxidativer Stress die Co-Kulturen in ihrem Proliferationsverhalten nicht beeinflusste. In oxidativ gestressten Zellen führte Ang II zu einer tendenziellen Erhöhung der Proliferation. Zusammenfassend zeigten die Proliferationsergebnisse in diesen drei Zellkultursystemen, dass Ang II eine Proliferationssteigerung in primären Schwann-Zellen und in Schwannoma-Zellen bewirkt, jedoch keine Wirkung auf Spinalganglien-Fibroblasten zeigt.

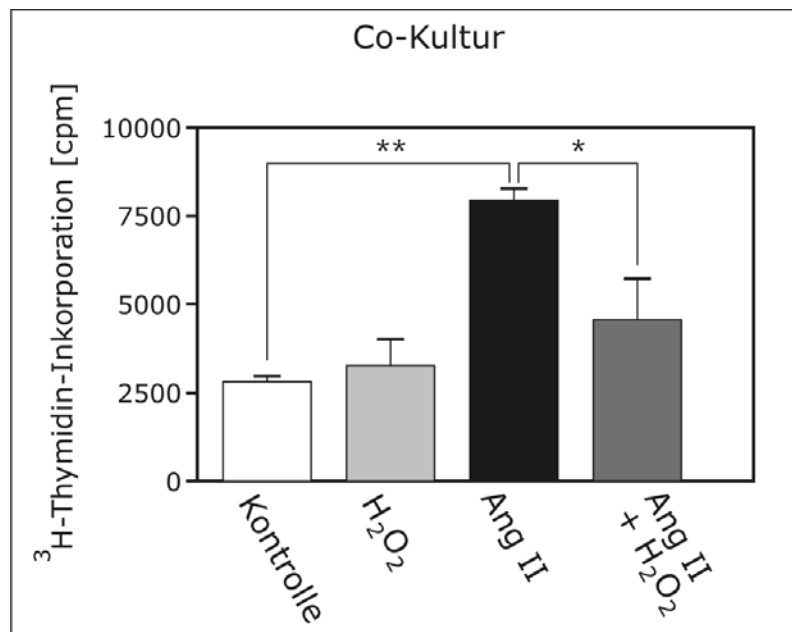


Abb. 3.19: Einfluss von Ang II auf das Proliferationsverhalten von Co-Kulturen. Co-Kulturen aus Spinalganglien-Fibroblasten (Ratte) und Schwannoma-Zellen (Maus) wurden für 24 Stunden mit 1 μ M H₂O₂, 1 μ M Ang II und der Kombinationen aus jeweils 1 μ M H₂O₂ und 1 μ M Ang II für 24 Stunden stimuliert. Nach Zugabe von 1 mCi / ml ³H-Thymidin während der letzten 6 Stunden der Stimulationszeit, wurde dessen Einbaurate in cpm gemessen und als Proliferationsmaß gewertet. Im Vergleich zu den Kontrollzellen führte eine 24-stündige Stimulation der Co-Kulturen mit 1 μ M Ang II zu einer signifikanten Proliferationserhöhung um das 2,83-fache \pm 0,07. Eine Stimulation mit 1 μ M H₂O₂ hatte auf das Proliferationsverhalten der Co-Kulturen kaum Einfluss. Die kombinierte Ang II / H₂O₂-Behandlung reduzierte den proliferationsfördernden Effekt von Ang II um den Faktor 1,7 \pm 0,5. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SEM (n = 9, ANOVA: p = 0,0002, Vergleich der Messgruppen nach Bonferroni: **p < 0,01, *p < 0,05).

3.4.3 Einfluss von Ang II auf die Proliferation von Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen in Gegenwart von AT₁- und AT₂-Rezeptorantagonisten

Um die gezeigte proliferationsfördernde Wirkung von Ang II auf Schwann-Zellen einem Ang II-Rezeptortyp zuzuordnen, wurden Ang II-stimulierte Schwannoma-Zellen, die zuvor mit dem AT₁-Rezeptorblocker Losartan bzw. mit dem AT₂-Rezeptorblocker PD123319 behandelt wurden, durchgeführt. Vergleichbare Experimente mit primären Schwann-Zell-Kulturen folgten.

3.4.3.1 Die proliferationssteigernde Wirkung von Ang II in Schwannoma-Zellen konnte keinem Ang II-Rezeptortypen zugeordnet werden

Es zeigte sich, dass alle Stimulanzien, mit Ausnahme von PD123319, die Proliferation der Schwannoma-Zellen signifikant steigerten. Im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Ang II die Proliferation von durchschnittlich 18722 cpm um den Faktor $2,7 \pm 0,37$ auf durchschnittlich 49885 cpm, Losartan um den Faktor $3,7 \pm 0,24$ auf durchschnittlich 70089 cpm, Ang II in Kombination mit Losartan um den Faktor $3,3 \pm 0,40$ auf durchschnittlich 62407 cpm und Ang II in Kombination mit PD123319 um den Faktor $3,4 \pm 0,29$. Eine Behandlung mit dem AT₂-Rezeptorantagonisten PD123319 übte eine tendenzielle proliferationssteigernde Wirkung auf die Schwannoma-Zellen um den Faktor $1,9 \pm 0,19$ aus.

Eine Blockade des mit Wachstumsprozessen in Verbindung gebrachten AT₁-Rezeptors mit Losartan führte nach einer Ang II-Stimulation zu keinem Rückgang der proliferationssteigernden Wirkung von Ang II, sondern erhöhte der Tendenz nach diese noch weiter um den Faktor $1,2 \pm 0,14$.

Ebenso wurde durch eine Blockade des mit antiproliferativen Prozessen in Verbindung gebrachten AT₂-Rezeptors mit PD123319 die Proliferation nach einer Ang II-Gabe tendenziell noch weiter gesteigert (Faktor $1,3 \pm 0,3$).

Diese Ergebnisse zeigten, dass Ang II in Schwannoma-Zellen Proliferationsprozesse induzieren kann, die aber keinem Rezeptorsubtypen zugeordnet werden können (Abb. 3.20).

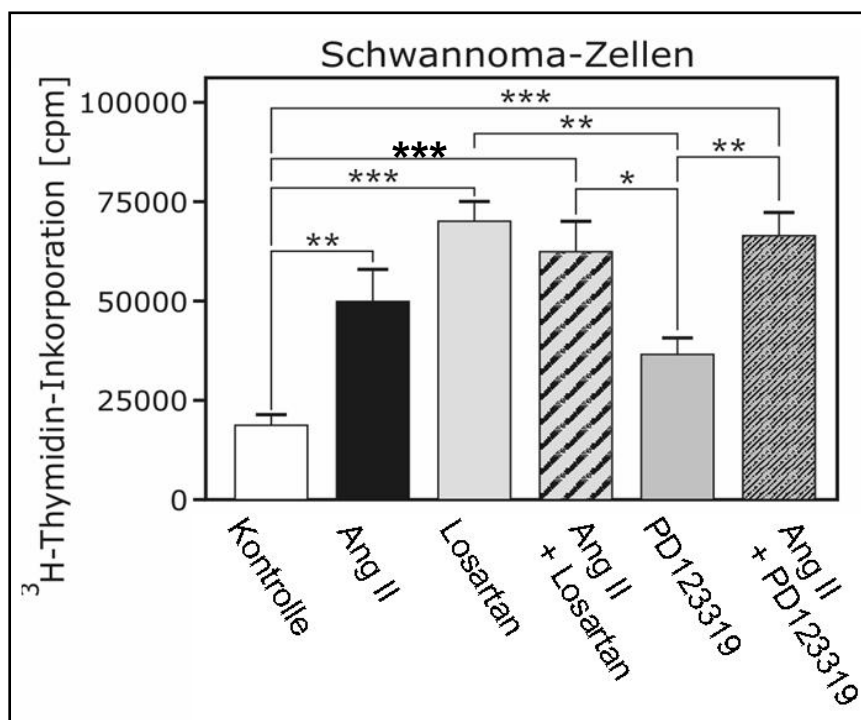


Abb. 3.20: Einfluss von Ang II-Rezeptorantagonisten auf die proliferationsfördernde Wirkung von Ang II in Schwannoma-Zellen. Schwannoma-Zellen wurden für 24 Stunden mit 1 μ M Ang II, mit 10 μ M Losartan, mit den Kombinationen aus 10 μ M Losartan und 1 μ M Ang II, mit 10 μ M PD123319 sowie mit der Kombination aus 10 μ M PD123319 und 1 μ M Ang II stimuliert. Während der letzten 6 Stunden der Stimulationszeit wurde das Medium zusätzlich mit 1 mCi/ml 3 H-Thymidin supplementiert, dessen Einbauraten anschließend in cpm gemessen und als Proliferationsmaß gewertet wurde. Im Vergleich zu den Kontrollzellen steigerten alle Stimulanzen, mit Ausnahme von PD123319, signifikant die Proliferation. Eine selektive Blockade des AT₁- oder AT₂-Rezeptors erhöhte die Tendenz nach der Ang II-induzierten Proliferation noch weiter. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SEM (n = 12, ANOVA: p < 0,0001, Vergleich der Messgruppen nach Bonferroni: ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05).

3.4.3.2 In primären Schwann-Zellen reduzierte eine Blockade des AT₁-Rezeptors die proliferationssteigernde Wirkung von Ang II, während eine Blockade des AT₂-Rezeptors diese noch weiter erhöhte

Die Ergebnisse zeigten wieder, dass eine Ang II-Stimulation von primären Schwann-Zellen zu einem Anstieg der Proliferationsrate führt. In diesem Versuch wurde die Proliferation von Ang II-stimulierten primären Schwann-Zellen um den Faktor $3,1 \pm 0,03$ von durchschnittlich 2023 cpm auf 6211 cpm gesteigert. Eine Blockade des mit Wachstumsprozessen in Verbindung gebrachten AT₁-Rezeptors mit Losartan reduzierte im Vergleich zu den alleinig mit Ang II stimulierten primären Schwann-Zellen die Proliferation um den Faktor $1,5 \pm 0,03$ von durchschnittlich 6211 cpm auf 4261 cpm, jedoch war die Proliferationsrate bezogen auf die unstimulierten Zellen immer noch signifikant um den Faktor $2,1 \pm 0,05$ von durchschnittlich 1223 cpm auf 4261 cpm erhöht. Eine Blockade des AT₂-Rezeptors mit PD123319 wirkte sehr stark proliferationsfördernd auf die primären

Schwann-Zellen. So bewirkte diese im Vergleich zur Kontrolle einen signifikanten Proliferationsanstieg um den Faktor $3,8 \pm 0,25$ von durchschnittlich 2023 cpm auf 7744 cpm und bezogen auf die alleinig mit Ang II stimulierten Zellen eine signifikante Proliferationssteigerung um den Faktor $1,2 \pm 0,09$ von durchschnittlich 6211 cpm auf 7744 cpm (Abb. 3.21).

Diese Ergebnisse bestätigten, dass Ang II in Schwann-Zellen Proliferationsprozesse induzieren kann und zeigten, dass diese insbesondere durch den AT₁-Rezeptor beeinflusst werden können.

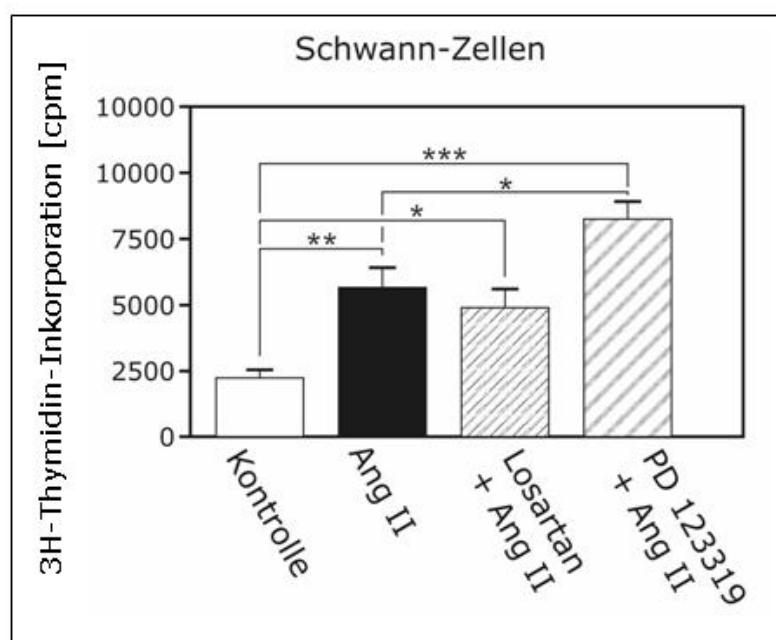


Abb. 3.21: Einfluss von Ang II-Rezeptorantagonisten auf die proliferationsfördernde Wirkung von Ang II. Schwann-Zellen wurden für 24 Stunden mit 1 μ M Ang II, der Kombinationen aus jeweils 10 μ M Losartan und 1 μ M Ang II sowie der Kombination aus 1 μ M PD123319 und 1 μ M Ang II stimuliert. Während der letzten 6 Stunden der Stimulationszeit wurde das Medium zusätzlich mit 1 mCi / ml ³H-Thymidin supplementiert, dessen Einbauraten anschließend in cpm gemessen und als Proliferationsmaß gewertet wurde. Im Vergleich zu den Kontrollzellen führte eine 24-stündige Stimulation der Schwann-Zellen mit 1 μ M Ang II zu einer signifikanten Proliferationserhöhung um den Faktor $3,1 \pm 0,03$. Die kombinierte Stimulation mit 10 μ M Losartan und 1 μ M Ang II reduzierte die Proliferationsrate signifikant um den Faktor $1,5 \pm 0,03$. 10 μ M PD123319 in Kombination mit 1 μ M Ang II erhöhte die Proliferation signifikant um den Faktor $3,8 \pm 0,25$. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SEM (n = 12, ANOVA: p = 0,0001, Vergleich der Messgruppen nach Bonferroni: ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05).

3.4.4 Auswirkung einer Ang II-Stimulation von Schwannoma-Zellen auf deren NGF-Expression und Freisetzung von NGF

Eine weitere notwendige Voraussetzung für eine funktionelle Restitution verletzter Nervenbahnen -außer der oben beschriebenen Proliferationssteigerung- ist die Anwesenheit und / oder die Produktion von neurotrophen Faktoren. Aus einer Vielzahl bekannter neurotropher Faktoren wurde hier beispielhaft NGF gewählt, um den Einfluss von Ang II auf die Produktion neurotropher Faktoren zu untersuchen.

Eine mögliche Ang II-induzierte Modulation der Expression des neurotrophen Faktors NGF wurde sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene untersucht. Parallel dazu wurde der Einfluss von oxidativem Stress auf die Expression der NGF-mRNA in Schwannoma-Zellen untersucht und mit der NGF-mRNA-Expression in den gleichzeitig mit H₂O₂ und Ang II behandelten Schwannoma-Zellen verglichen.

3.4.4.1 Sowohl Ang II als auch oxidativer Stress induzierten tendenziell eine erhöhte NGF-mRNA-Expression in Schwannoma-Zellen

Eine mögliche Modulation der NGF-mRNA-Expression durch Ang II sowie die Einflussnahme des oxidativen Stressauslösers H₂O₂ auf diese wurde an Schwannoma-Zellen mittels *realtime*-RT-PCR untersucht. Dafür wurden die Schwannoma-Zellen mit den entsprechenden Stimulantien behandelt. Die anschließend aus den Zellen isolierte RNA wurde *revers* transkribiert und mit Hilfe des Sybr[®]Green-Systems und spezifischer Primer (Tab. 2.3) die NGF-Rezeptorexpression quantifiziert. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde die Kontrolle gleich 1 gesetzt.

Abb. 3.22 zeigt die NGF-mRNA-Expression nach einer 24-stündigen Stimulation. Es wurde mit allen Stimulanzen eine tendenzielle Erhöhung der NGF-mRNA-Expression erreicht. Oxidativer Stress erhöhte die NGF-mRNA-Expression tendenziell auf das 2,5-fache $\pm 1,64$, 1 μ M Ang II auf das 1,5-fache $\pm 0,40$ und die kombinierte Stimulation mit H₂O₂ und 1 μ M Ang II führte ebenfalls tendenziell zu einer Erhöhung der NGF-mRNA auf das 1,5-fache $\pm 0,30$. Nach einer Stimulation mit 10 μ M Ang II konnte eine tendenzielle Steigerung der NGF-mRNA-Expression auf das 2,4-fache $\pm 1,16$ und nach der kombinierten Stimulation mit H₂O₂ und 10 μ M Ang II auf das 3,4-fache $\pm 2,25$ gemessen werden.

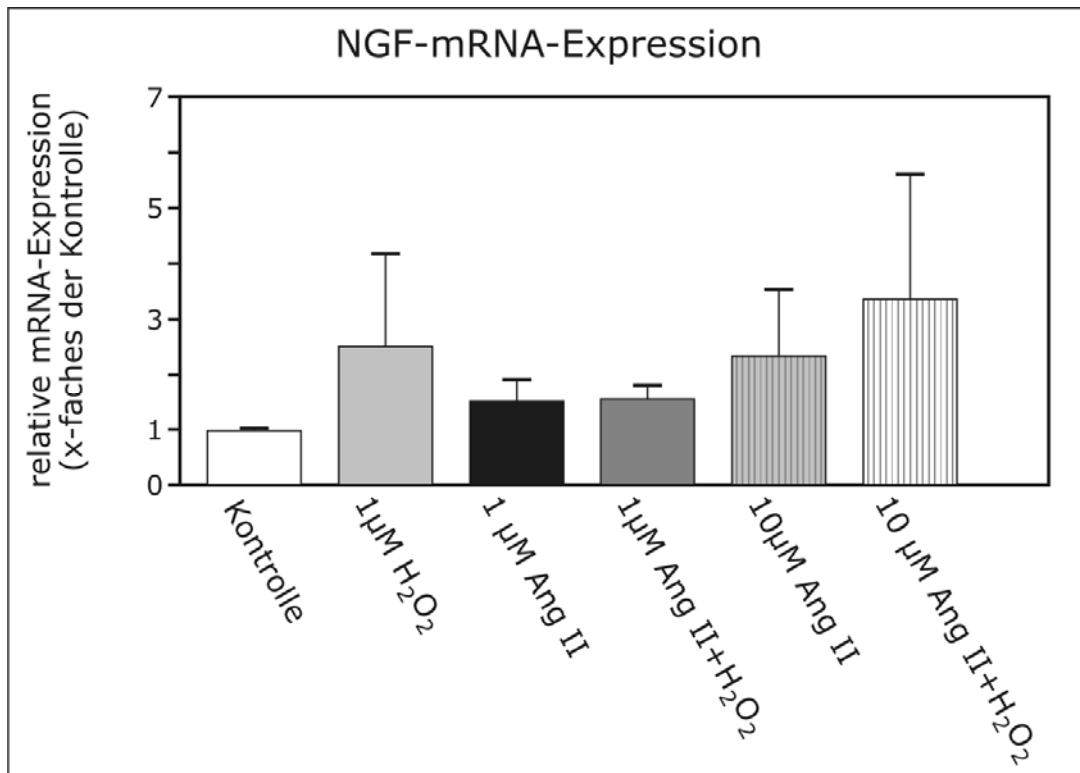


Abb. 3.22: Nachweis des Einflusses von Ang II auf die NGF-mRNA-Expression in oxidativ gestressten und ungestressten Schwannoma-Zellen mittels *realtime*-RT-PCR. Für die relative Quantifizierung der mRNA für NGF wurden Schwannoma-Zellen entweder mit 1 µM H₂O₂, mit 1 µM Ang II, mit 10 µM Ang II oder mit den Kombinationen aus 1 µM Ang II und 1 µM H₂O₂ bzw. mit 10 µM Ang II und 1 µM H₂O₂ stimuliert. Aus den Zellen wurde die RNA isoliert, *revers* transkribiert und je Probe 10 ng cDNA in der *realtime*-RT-PCR eingesetzt, um mit Hilfe mausspezifischer Primer für NGF und dem Sybr[®]Green-System die relative Expression der mRNA zu analysieren. Sowohl H₂O₂ als auch Ang II steigerten tendenziell die NGF-mRNA-Expression. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SEM (n = 6, ANOVA: p = 0,7923).

3.4.4.2 Ang II stimulierte Schwannoma-Zellen zur erhöhten NGF-Freisetzung

Nachdem die Untersuchungen zur NGF-mRNA-Expression gezeigt hatten, dass Ang II darauf keinen signifikanten jedoch der Tendenz nach steigernden Einfluss ausübt, sollte nun auf Proteinebene eine Ang II-vermittelte Wirkung untersucht werden.

Die quantitative Analyse der Ang II-vermittelten Freisetzung von NGF aus Schwannoma-Zellen wurde mittels eines NGF-Sandwich-ELISAs durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 3.23 dargestellt und zeigen, dass Ang II die Schwannoma-Zellen zur Freisetzung von NGF stimulieren konnte. 1 µM Ang II induzierte, bezogen auf die unstimulierte Kontrolle, eine signifikante Erhöhung der NGF-Freisetzung um den Faktor $1,7 \pm 0,18$ von durchschnittlich 30,42 pg / ml auf 51,19 pg / ml, wohingegen 10 µM Ang II die NGF-Freisetzung tendenziell um den Faktor $1,4 \pm 0,01$ von durchschnittlich 30,42 pg / ml auf 41,40 pg / ml erhöhte.

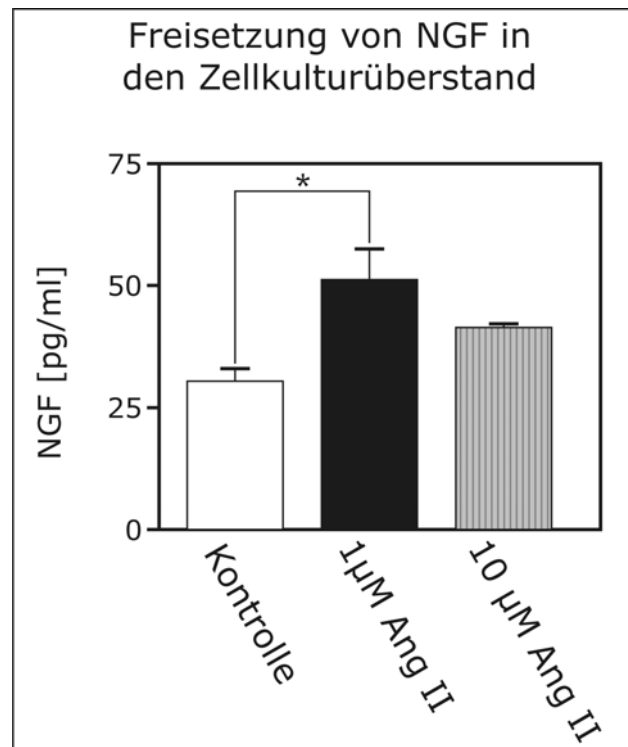


Abb. 3.23: Einfluss von Ang II auf die Freisetzung von NGF. Schwannoma-Zellen wurden für 24 Stunden mit 1 µM Ang II bzw. 10 µM Ang II inkubiert und anschließend die Konzentration von NGF im Zellkulturüberstand mittels eines NGF-ELISAs bestimmt. Im Vergleich zu den Kontrollzellen führte eine 24-stündige Stimulation der Schwannoma-Zellen mit 1 µM Ang II zu einer signifikanten Erhöhung der NGF-Freisetzung um den Faktor $1,7 \pm 0,18$ und mit 10 µM Ang II zu einer tendenziellen Erhöhung um den Faktor $1,4 \pm 0,01$. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SEM ($n = 4$, ANOVA: $p = 0,0252$, Vergleich der Messgruppen nach Bonferroni: $*p < 0,05$).

3.4.5 Einfluss von Ang II auf die NO-Produktion und die mRNA-Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen

In den letzten Jahren gab es vermehrt Hinweise darauf, dass bei einer Verletzung peripherer Nerven auch Entzündungsprozesse für die Pathogenese von Neuropathien eine Rolle spielen. Daher stellte sich die Frage, ob Ang II die zelluläre Produktion von NO, einem der Hauptmediatoren, positiv oder negativ beeinflussen kann.

Zur Klärung dieser Frage wurde eine mögliche Ang II-vermittelte Modulation der NO-Synthese in Schwannoma-Zellen sowohl im Zellkulturüberstand als auch auf mRNA-Ebene untersucht. Um vorher zu überprüfen, ob sich die in dieser Arbeit eingesetzten Schwannoma-Zellen überhaupt zur NO-Produktion stimulieren lassen, wurde zunächst nach geeigneten Stimulanzen gesucht, die Schwann-Zellen und Schwannoma-Zellen zuverlässig zur NO-Freisetzung anregen. Aus der Literatur war zu entnehmen, dass nach einer kombinierten Stimulation mit IFN- γ und TNF- α Schwann-Zellen innerhalb von 12 Stunden die Expression der iNOS-mRNA erhöhen

und große Mengen an NO in den Zellkulturüberstand freisetzen (Gold *et al.*, 1996). Dieser Hinweis wurde im nachfolgenden Versuch überprüft. Für die Quantifizierung von NO im Zellkulturüberstand von Schwannoma-Zellen, die mit IFN- γ und / oder TNF- α stimuliert waren, wurden die Schwannoma-Zellen entweder einzeln mit IFN- γ in folgenden Konzentrationen: 10 ng / ml, 25 ng / ml, 50 ng / ml und einzeln mit TNF- α in folgenden Konzentrationen: 5 ng / ml, 15 ng / ml 25 ng / ml oder mit den Kombinationen aus den jeweiligen IFN- γ - und TNF- α -Konzentrationen für 24 Stunden stimuliert. Da NO nur eine Halbwertszeit von 6-10 Sekunden hat, wurde die Menge an produziertem NO durch Messung der Menge an akkumuliertem NO₂ mit Hilfe des Griess-Reagenz im Zellkulturüberstand ermittelt.

Einzelstimulationen mit IFN- γ oder TNF- α hatten keinen Einfluss auf die NO-Produktion in Schwannoma-Zellen (Abb. 3.24 A). Die gemessenen Werte entsprachen denen der Kontrolle und lagen noch weit unter dem geringsten Wert der Standards im pmol-Bereich, weshalb eine quantitative Erfassung der NO-Produktion nicht möglich war. Im Gegensatz dazu stimulierten TNF- α und IFN- γ gemeinsam die Schwannoma-Zellen in allen Kombinationen signifikant zur NO-Produktion (Abb. 3.24 B). Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch eine geringere Konzentration von TNF- α in Kombination mit 10 ng / ml IFN- γ die Zellen noch signifikant zur NO-Produktion stimulierte (ohne Abb.). Für nachfolgende Zellstimulationen zur Messung der NO-Produktion wurde deshalb die Kombination aus 2,5 ng / ml TNF- α und 10 ng / ml IFN- γ als Positivkontrolle eingesetzt.

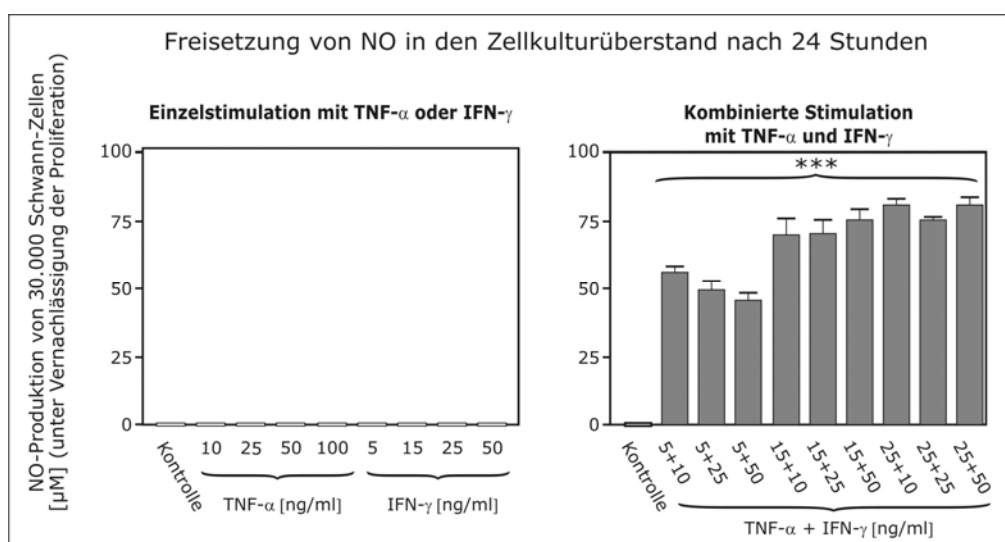


Abb. 3.24: Austestung des Einflusses von TNF- α und IFN- γ auf die Freisetzung von NO in den Zellkulturüberstand von Schwannoma-Zellen. Schwannoma-Zellen wurden für 24 Stunden entweder einzeln mit IFN- γ oder TNF- α (A) oder kombiniert (B) in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert und der NO-Gehalt im Zellkulturüberstand ermittelt. A: Die Einzelstimulationen hatten keinen Einfluss auf die NO-Produktion. B: Jede gewählte Konzentrations-Kombination von IFN- γ und TNF- α führte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu einer signifikanten Erhöhung der NO-Produktion. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SEM (n =5, ANOVA: p < 0,0001, Vergleich der Messgruppen nach Bonferroni: ***p < 0,001).

3.4.5.1 Ang II hatte keinen Einfluss auf die NO-Freisetzung von Schwannoma-Zellen

Ausgangspunkt einer erfolgreichen Nervenregeneration ist die Waller-Degeneration. Daran sind Schwann-Zellen, Makrophagen und T-Zellen essentiell beteiligt. Es ist bekannt, dass Makrophagen während einer Waller-Degeneration u. a. den Entzündungsmediator NO freisetzen, was im positiven Sinne mit dazu beiträgt, die T-Zellen im Verletzungsgebiet durch Apoptose zu eliminieren und damit letztlich gute Bedingungen für regenerative Prozesse zu schaffen. Auch Schwann-Zellen können Entzündungsreaktionen im PNS hervorrufen und dabei verschiedene inflammatorische Moleküle freisetzen. Um zu untersuchen, ob Ang II in den Schwannoma-Zellen die Produktion von NO stimulieren kann, wurde die NO-Konzentration im Zellkulturüberstand Ang II-stimulierter Schwannoma-Zellen quantifiziert.

Für die Quantifizierung von NO im Zellkulturüberstand von Ang II-stimulierten Schwannoma-Zellen wurden die Zellen mit Ang II in verschiedenen Konzentrationen (1 μM , 2 μM und 5 μM) sowie mit der Kombination aus 2,5 ng / ml TNF- α + 10 ng / ml IFN- γ als Positivkontrolle stimuliert. Nach 24 Stunden wurde mit Hilfe des Griess-Reagenz das akkumulierte NO₂ nachgewiesen.

Sowohl für die Kontrollzellen als auch für die Ang II-stimulierten Schwannoma-Zellen wurden NO₂-Konzentrationen ermittelt, welche unterhalb des messbaren Bereiches lagen. Dahingegen wurden in den kombiniert mit TNF- α und IFN- γ -stimulierten Schwannoma-Zellen NO₂-Konzentrationen von 41,85 μM nachgewiesen (Abb. 3.25). Dieses Ergebnis zeigte, dass sich Schwannoma-Zellen in Anwesenheit von proinflammatorischen Zytokinen zur NO-Produktion stimulieren lassen, Ang II aber nicht in der Lage ist- zumindest in den eingesetzten Mengen- eine NO-Freisetzung zu bewirken.

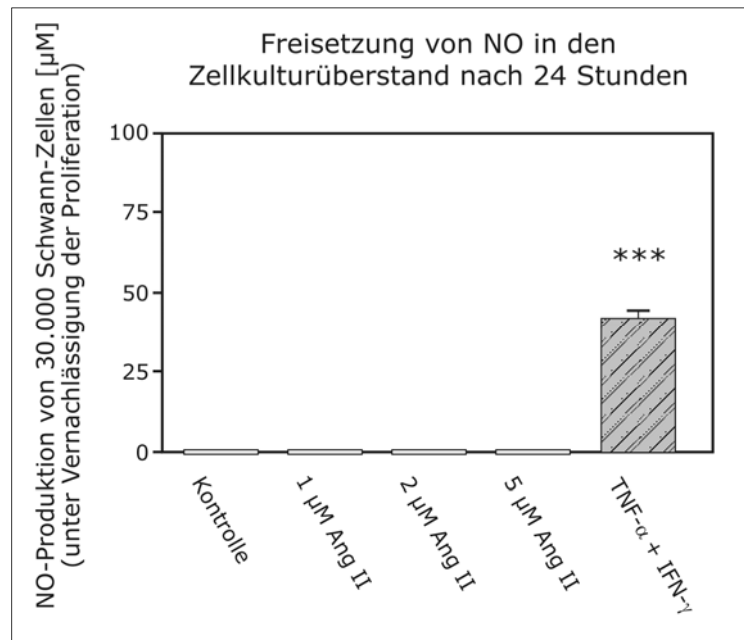


Abb. 3.25: Einfluss von Ang II auf die Freisetzung von NO in den Zellkulturüberstand von Schwannoma-Zellen. Schwannoma-Zellen wurden für 24 Stunden mit Ang II in verschiedenen Konzentrationen stimuliert und der NO-Gehalt im Zellkulturüberstand ermittelt. Ang II stimuliert die Schwannoma-Zellen nicht zur NO-Produktion, während TNF- α und IFN- γ in Kombination die Schwannoma-Zellen zu einer signifikanten NO-Freisetzung stimulierten. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SEM (n = 5, ANOVA: p < 0,0001, Vergleich der Messgruppen nach Bonferroni: ***p < 0,001).

3.4.5.2 Ang II übt auch auf die iNOS-mRNA-Expression in primären Schwann-Zellen keinen Einfluss aus

NO wird in den Zellen durch verschiedene NO-Synthasen (NOS) gebildet, von denen in der vorliegenden Arbeit eine mögliche ANG II-vermittelte Modulation der induzierbaren NOS (iNOS) auf mRNA-Ebene in Schwann-Zellen untersucht wurde. Zunächst wurde der qualitative Nachweis von iNOS-mRNA-Transkripten in primären Schwann-Zellen mit Hilfe der RT-PCR erbracht. Dafür wurden die primären Schwann-Zellen für 24 Stunden mit 1 μ M Ang II sowie mit der Kombination aus 25 ng / ml TNF- α und 10 ng / ml IFN- γ stimuliert. Aus den Zellen wurde die RNA isoliert, *revers* transkribiert und mit spezifischen Primern (Tab. 2.1) die iNOS-mRNA-Expression untersucht.

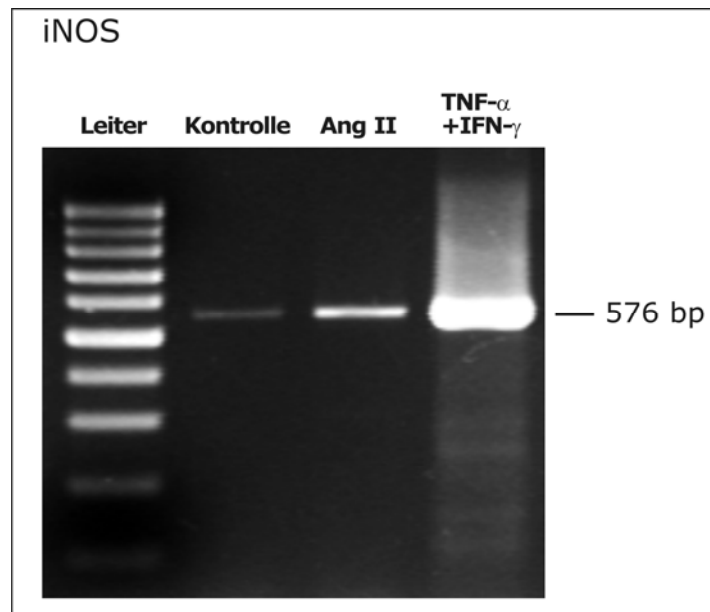


Abb. 3.26: Expression von mRNA-Transkripten der iNOS. Die RNA von primären Schwann-Zellen, die entweder mit 1 μM Ang II oder der Kombination aus 25 ng / ml $\text{TNF-}\alpha$ und 10 ng / ml $\text{IFN-}\gamma$ stimuliert wurden bzw. unbehandelt waren (Kontrolle) wurde isoliert, *revers* transkribiert und in einer RT-PCR mit spezifischen Primern für die iNOS (576 bp) oder Beta-Actin als interne PCR-Kontrolle (ohne Darstellung, 281 bp) eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 2 %igen Agarose-Gel getrennt und nach einer Inkubation in Ethidiumbromid anhand eines Standards (100 bp Leiter) und unter UV-Licht detektiert. Die intensivere Bande der Leiter repräsentiert die 500 bp-Marke.

Es konnten spezifische Banden für die iNOS (576 bp) in allen Ansätzen nachgewiesen werden (Abb. 3.26). Jedoch gab es Unterschiede in der Intensität der Banden, weshalb in einem weiteren Schritt die iNOS-mRNA-Expression mittels *realtime*-RT-PCR mit dem TaqMan[®]-System quantitativ analysiert wurde.

Für die *realtime*-RT-PCR wurde aus Ang II-stimulierten primären Schwann-Zellen die RNA isoliert, *revers* transkribiert und mit Hilfe Ratten- und iNOS rezeptorspezifischer TaqMan[®]-Sonden (Tab. 2.2) die iNOS-Expression sowie die Expression des nichtregulierten 'Housekeeping Gens' 18S rRNA (Tab. 2.2) relativ quantifiziert. Anhand der Expression des 'Housekeeping Gens' wurde die relative Expression der iNOS normalisiert. Die Ergebnisse der stimulierten Proben wurden auf die unbehandelte Kontrollprobe bezogen und die Ratio mit der $\Delta\Delta\text{C}_\text{T}$ -Methode berechnet. Bei der grafischen Auswertung der Ergebnisse wurde die Kontrolle jeweils gleich 1 gesetzt.

Trotz mehrerer Versuche konnten mittels *realtime*-RT-PCR keine eindeutigen, Ergebnisse zum Einfluss von Ang II auf die Expression von iNOS-mRNA in primären Schwann-Zellen erzielt werden, obwohl die Ergebnisse der RT-PCR (Abb. 3.26) eine Ang II-induzierte Steigerung der iNOS-mRNA-Expression aufgrund der

Bandenintensität vermuten ließen. Die kombinierte Behandlung mit TNF- α und IFN- γ steigerte die iNOS-mRNA-Expression signifikant (ohne Abb.).

3.4.6 Ang II induzierte keine Apoptose in Schwannoma-Zellen und in primären Schwann-Zellen

Zu Beginn neuroregenerativer Prozesse im PNS sezernieren Schwann-Zellen Wachstumsfaktoren und beginnen zu proliferieren. Sind die Regenerationsprozesse jedoch abgeschlossen, werden die überzähligen Schwann-Zellen durch Apoptose beseitigt. Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten, dass Ang II primäre Schwann-Zellen und Schwannoma-Zellen nach 24 Stunden signifikant zur Proliferation stimulieren konnte. Um zu untersuchen, ob eine Ang II-Stimulation über einen längeren Zeitraum und in höherer Konzentration in den Schwann-Zellen apoptotische Vorgänge auslöst, wurden dazu Untersuchungen an Schwannoma-Zellen durchgeführt.

Zur Analyse einer möglichen zeit- und / oder konzentrationsabhängigen Ang II-induzierten Auslösung von Apoptose in Schwann-Zellen und Schwannoma-Zellen wurde mit Hilfe des *DNA-Ladderings* untersucht, welchen Einfluss verschiedene Ang II-Konzentrationen diesbezüglich auf die Zellen ausüben.

In den Ang II-stimulierten Zellen sowie in den Kontrollzellen gab es aufgrund des DNA-Bandenmusters keinen Hinweis auf Apoptose. Die DNA war nach allen Inkubationszeiten noch intakt, was daran zu erkennen war, dass sie bis zu einem bestimmten Punkt im elektrischen Feld wanderte und dort nur eine größenspezifische Bande bildete. Da die Gesamt-DNA der Zellen untersucht wurde, befanden sich diese Banden der Größe nach außerhalb des mitgeführten DNA-Standards, der als größten Wert die 1500 bp-Marke angibt. Dahingegen induzierte Rotenon als Positivkontrolle in den Schwannoma-Zellen Apoptose, was an dem typisch fragmentierten (*geladderten*) DNA-Muster 7, (Abb. 3.27, schwarze Pfeile) zu erkennen ist.

Auch in primären Schwann-Zellen wurde nach verschiedenen Ang II-Behandlungen kein Hinweis auf Apoptose gefunden (ohne Abb.).

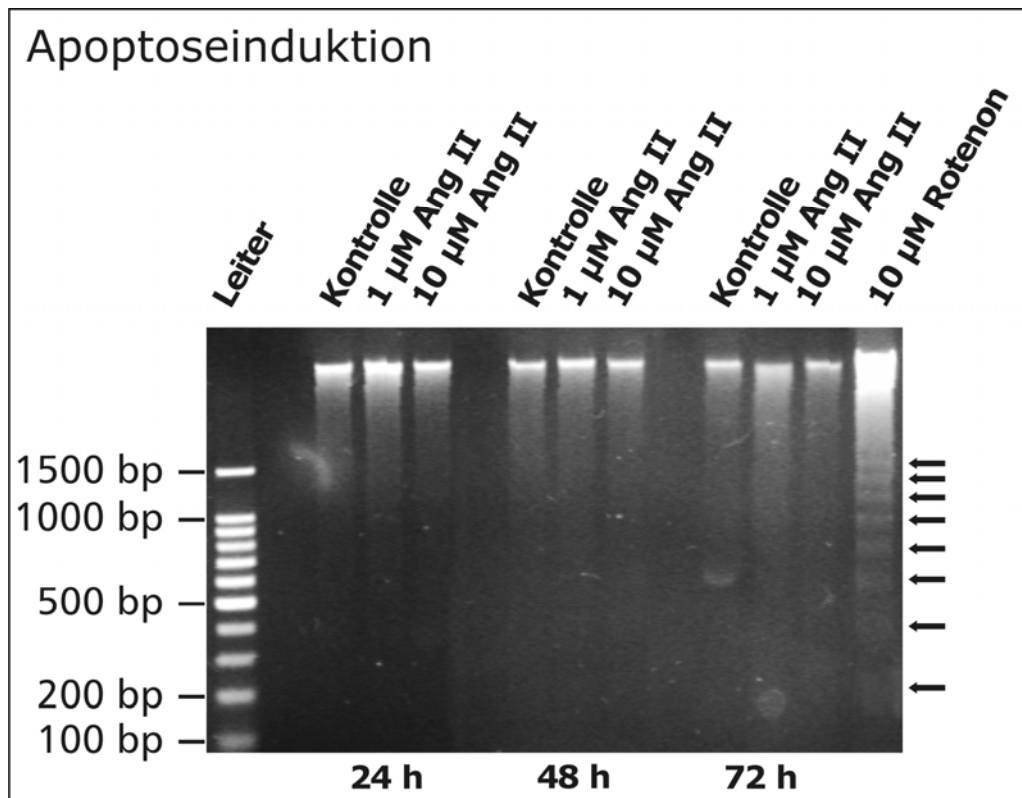


Abb. 3.27: Untersuchung einer möglichen Apoptose-Induktion in Schwannoma-Zellen durch Ang II. Schwannoma-Zellen wurden für 24, 48 und 72 Stunden mit 1 µM oder 10 µM Ang II sowie mit 10 µM Rotenon als Positivkontrolle stimuliert. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die aus den Zellen isolierte DNA wurde quantifiziert und je Probe 2 µg in einem 2 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Nach einer Ethidiumbromid-Behandlung des Gels, wurden unter UV-Licht anhand eines Standards (100 bp Leiter) die DNA-Banden detektiert. Ang II induzierte in den Zellen keine Apoptose, während Rotenon eine DNA-Fragmentierung und damit nachweislich Apoptosevorgänge in den Schwannoma-Zellen auslöste.

3.5 Einfluss von Ang II auf die axonale Regeneration *in vivo*

Wie zu Beginn (Kap. 3) beschrieben, soll nun im folgenden Abschnitt eine detaillierte Betrachtung der Ang II-vermittelten Beschleunigung der Regeneration peripherer Axone (Reinecke *et al.*, 2003) erfolgen.

Um zu überprüfen, inwieweit der neuroregenerative Einfluss von Ang II auf Schwann-Zellen auch histologisch direkt am verletzten Nerven erkennbar ist, wurde zum Einen der Einfluss von Ang II auf die Regeneration verletzter Nervenfasern mittels einer immunhistochemischen Färbung des Membranproteins GAP-43 und zum Anderen mittels einer Myelinscheidenfärbung der Grad der Myelinisierung der regenerierenden Axone am Tag 20 nach der Läsion untersucht. Diese Nervensegmente wurden 10 mm distal einer Quetschläsion des *N. ischiadicus* aus perfundierten Ratten präpariert, welche zuvor Testreihen zur Untersuchung der

funktionellen Auswirkungen einer kontinuierlichen Applikation verschiedener Ang II-Konzentrationen an den Ort der Nervenläsion unterzogen wurden.

Es wurden für die vorliegende Arbeit ausschließlich die *Nn. ischiadici* der Versuchstiere für die Untersuchungen herangezogen, denen entweder physiologische Kochsalzlösung (Kontrollgruppe) bzw. 10^{-11} M Ang II ('Ang II - Gruppe'), 10^{-11} M Ang II in Kombination mit 10^{-7} M PD 123319 ('Ang II / PD123319-Gruppe') oder 10^{-11} M Ang II in Kombination mit 10^{-7} M Losartan ('Ang II / Losartan-Gruppe') über einen Zeitraum von 20 Tagen kontinuierlich injiziert worden war.

3.5.1 Ang II übte *in vivo* eine positive Wirkung auf die GAP-43-Expression in verletzten Nervenfasern aus und förderte die axonale Regeneration

Das Membranprotein GAP-43 wird vor allem in sich entwickelnden Neuronen und in regenerierenden Nervenfasern synthetisiert und kann somit auch mit axonalen Regenerationsprozessen in Verbindung gebracht werden.

Um den Einfluss von Ang II auf das axonale Neuwachstum nach einer Nervenläsion zu untersuchen, wurde in Gefrier-Längsschnitten von *Nn. ischiadici* das Protein GAP-43 immunologisch und mit dem Chromogen DAB über eine Enzym-Substrat-spezifische Farbreaktion angefärbt. Die Untersuchungen erfolgten an den in Kap. 3.5 beschriebenen Versuchstiergruppen.

Auffallend für alle untersuchten Gruppen war, dass die Quetschläsionsstellen das Wachstum der regenerierenden Axone nicht begrenzten und die Wachstumskegel der neuaussprossenden Axone im untersuchten Bereich nicht mehr sichtbar waren (Abb. 3.28 A-D). In der Kontrollgruppe wurde das Protein GAP-43 nur schwach in einigen Nervenfasern angefärbt (Abb. 3.28 A), während in der 'Ang II -Gruppe' sehr viele Axonbündel eine intensive GAP-43-Anfärbung aufwiesen (Abb. 3.28 B). In der 'Ang II / PD123319-Gruppe' zeigten die Nervenfasern eine schwache Färbung von GAP-43, die vergleichbar der Kontrolle war (Abb. 3.28 C). Demgegenüber war in der 'Ang II / Losartan-Gruppe' in den meisten Axonbündel GAP-43 intensiv angefärbt (Abb. 3.28 D). Die Ergebnisse dieser Gruppe waren vergleichbar mit den Resultaten der 'Ang II -Gruppe'. Diese Ergebnisse zeigen, dass Ang II *in vivo* eine verstärkte GAP-43-Anfärbung von verletzten *Nn. ischiadici* bewirkte, welche durch eine gleichzeitige Behandlung mit dem AT_2 -Rezeptorantagonisten PD123319 blockiert werden konnte. Der AT_1 -Rezeptorantagonist Losartan konnte dagegen die erhöhte GAP-43-Färbung nicht blockieren.

3.5.2 Ang II beschleunigte *in vivo* die Remyelinisierung verletzter Nervenfasern

Im PNS bilden Schwann-Zellen eine Myelinscheide um die Nervenfasern, indem sie sich in mehreren Windungen um die Axone wickeln. Dabei ist die Dicke der Myelinscheide proportional dem Axondurchmesser. Durch die Myelinisierung wird die Leitungsgeschwindigkeit der Axone erhöht, und sie können für längere Zeit mit höherer Frequenz Aktionspotentiale übertragen. Bei einer Verletzung des Axons, z. B. durch eine Quetschläsion, laufen in der Nervenzelle zunächst die von Waller beschriebenen Degenerationsprozesse ab, in deren Folge es u. a. zu einem Verlust der distal von der Verletzungsstelle liegenden Myelinscheiden kommt. Gelingt es jedoch der Nervenzelle ihre synaptischen Kontakte wiederherzustellen, kann das Axon regenerieren und wird erneut von Schwann-Zellen myelinisiert.

Um den Einfluss von Ang II auf die Remyelinisierung verletzter Nervenfasern zu untersuchen, wurde in semidünnen Querschnitten der *Nn. ischiadici* (20. Tag nach einer Läsion) von den in Kap. 3.5 beschriebenen Versuchstiergruppen die Myelinscheiden mit Paraphenyldiamin angefärbt und lichtmikroskopisch betrachtet. In der Kontrollgruppe waren nur wenige Myelinscheiden angefärbt, d. h. die meisten Axone waren nicht oder nur wenig myelinisiert (Abb. 3.28 a), während die Anzahl der myelinisierten Axone und deren Durchmesser in der 'Ang II -Gruppe' im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich zugenommen hatte (Abb. 3.28 b). Ein ähnliches Ergebnis wie die Kontrollgruppe zeigte die 'Ang II / PD123319-Gruppe'. Hier konnte bei einzelnen wenigen Axonen eine Myelinscheide detektiert werden (Abb. 3.28 c). Dahingegen war in der 'Ang II / Losartan-Gruppe' die Anzahl der remyelinisierten Axone, verglichen mit der Kontrollgruppe um ein Vielfaches gestiegen (Abb. 3.28 d).

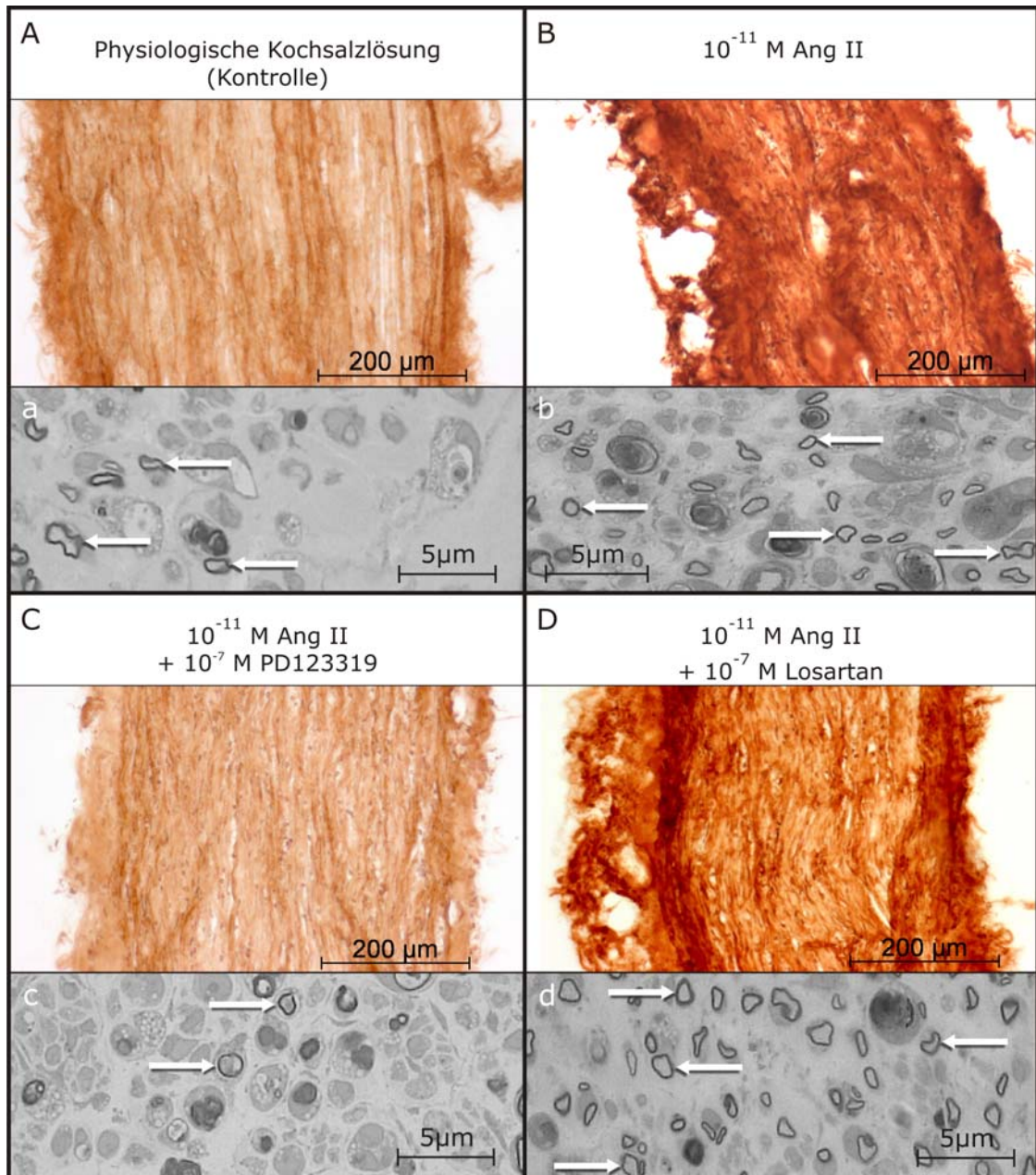


Abb. 3.28: Lichtmikroskopische Darstellung repräsentativer GAP-43-gefärbter Gefrier-Längsschnitte (5 μm Schnittdicke) von *Nn. ischiadici* (A-D) sowie Darstellung der Myelinscheiden an semidünnen (1 μm Schnittdicke) *Nn. ischiadici*-Querschnitten (a-d). Nervensegmente, 10 mm distal einer Quetschläsion von *Nn. ischiadici* erwachsener Sprague Dawley Ratten, wurden 20 Tage nach der Läsion entnommen und histologisch untersucht. An längs geschnittenen Nervensegmenten wurde das Protein GAP-43 mit einem polyklonalen Primärantikörper detektiert und Enzym-Substrat-spezifisch mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und dem Chromogen DAB braun angefärbt (A-D). An quer geschnittenen Nervensegmenten wurden die myelinisierten Nervenfasern nach der Methode von Estable-Puig *et al.* (1965) mit Paraphenylen-diamin gefärbt (a-d).

A+a: *N. ischiadicus* eines mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Kontrolltieres, **B+b:** *N. ischiadicus* eines mit 10^{-11} M Ang II behandelten Tieres, **C+c:** *N. ischiadicus* eines mit der Kombination aus 10^{-11} M Ang II und 10^{-7} M PD123319 behandelten Tieres, **D+d:** *N. ischiadicus* eines mit der Kombination aus 10^{-11} M Ang II und 10^{-7} M Losartan behandelten Tieres. Die stärkere GAP-43-Färbung in B und D ist Ausdruck einer gesteigerten Regeneration verletzter Nervenfasern in diesen beiden experimentellen Gruppen. Auch auf die Remyelinisierung hatte Ang II eine positive und steigernde Wirkung im Vergleich zur Kontrolle (a). Die Pfeile in den Abbildungen a-d zeigen auf einige, als dunkle Ringe zu erkennenden, Paraphenylen-gefärbte Myelinscheiden.

Diese Ergebnisse zeigten, dass Ang II *in vivo* positiv auf das axonale Wachstum sowie die Remyelinisierung verletzter Nervenfasern wirkt. Dieser Effekt konnte durch die gleichzeitige Behandlung mit dem AT₂-Rezeptorantagonisten PD123319 unterbunden werden. Diese morphologischen Daten decken sich mit den funktionellen Daten, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Th. Unger, (Pharmakologisches Institut des UK SH; Campus Kiel) erhoben wurden.

4 Diskussion

Schwann-Zellen spielen bei der Regeneration verletzter Nerven im PNS eine zentrale Rolle. Sie verändern während dieser Zeit nicht nur ihren Phänotyp, sondern durchlaufen auch eine Reihe von Veränderungen in ihrem Genexpressionsmuster (Campana, 2007), wodurch sie einen entscheidenden Beitrag für eine erfolgreiche Nervenreparatur leisten. Dabei kommt es in den Schwann-Zellen zu einer Heraufregulation des proinflammatorischen Zytokins TNF- α , sowie zu einer erhöhten Expression inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 und IL-6. Gleichzeitig wird in den Schwann-Zellen Proliferation und Dedifferenzierung induziert. Die dedifferenzierten Schwann-Tochterzellen regulieren die Expression von Myelin-Protein-Genen herunter und gleichzeitig die Genexpression von p75^{NTR} und Regenerations-assoziierten Proteinen, wie NGF, BDNF, NCAM, L1, Laminin und Fibronektin herauf. Sie lagern sich aneinander und bilden 'Büngnersche Bänder', an denen die proximal neuaussprossenden Axone in Richtung Zielorgan entlang wachsen (Vargas und Barres, 2007; Gould, 1990). Durch ihre bedeutende Funktion bei der Reparatur, aber auch beim Aufbau und dem Erhalt eines peripheren Nervs, stellen Schwann-Zellen einen interessanten Ansatzpunkt für Pharmaka, die zur Beschleunigung der axonalen Regeneration im PNS beitragen können, dar.

Frühere *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe im Sehsystem der Ratte zeigten, dass das Peptidhormon Ang II neuroregenerative Eigenschaften im ZNS besitzt (Lucius *et al.*, 1998). Ang II kann über seinen AT₂-Rezeptor neuronale Differenzierung in Zellen der permanenten Zelllinie PC 12W (Stroth *et al.*, 1998; Gallinat *et al.*, 1997; Meffert *et al.*, 1996) sowie das Auswachsen von Axonen in der Neuroblastom x Gliom Hybrid Zelllinie NG108-15 (Laflamme, 1996) induzieren. Auch zeigten *in vivo* Studien im Tiermodell des gequetschten *N. ischiadicus*, dass Ang II den Regenerationsverlauf signifikant positiv beeinflusst (Reinecke *et al.*, 2003).

Vor diesem Hintergrund sollten in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Ang II auf Schwann-Zellen im Hinblick auf eine Beeinflussung von Schwann-Zell-Funktionen, die mit axonaler Regeneration in Zusammenhang gebracht werden können, untersucht werden. Die Untersuchungen sollten an Zellen einer Schwannoma-Zelllinie und / oder an primären Schwann-Zellen erfolgen. Es sollte dafür eine

Methode zur Präparation und Kultivierung primärer Ratten-Schwann-Zellen etabliert werden. Ferner sollten histologische Untersuchungen an gequetschten *Nn. ischiadici* adulter *in vivo* mit Ang II behandelte Ratten zeigen, wie Ang II direkt am verletzten Nerven wirkt.

4.1 Primäre Schwann-Zell-Kulturen

Ausgehend von der, durch die *in vivo*-Ergebnisse (Reinecke *et al.*, 2003) aufgestellte Hypothese, dass Schwann-Zellen Zielzellen für Ang II in peripheren Nerven sind, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Ang II auf Schwann-Zellen untersucht werden. Die Versuche wurden hauptsächlich an Schwannoma-Zellen, einer permanenten Schwann-Zell-Linie, aber auch an primären Schwann-Zellen durchgeführt.

Für die Versuchsdurchführung an Primärkulturen konnte in der vorliegenden Arbeit eine Methode zur Isolierung und Kultivierung primären Schwann-Zellen etabliert werden. Mit dieser Methode war es möglich, innerhalb einer kurzen Zeitspanne primäre Schwann-Zell-Kulturen in einem hohen Reinheitsgrad zu züchten. Die Schwann-Zellen wurden mechanisch und enzymatisch entweder aus präparierten *Nn. ischiadici* oder aus Spinalganglien früh postnataler Ratten isoliert, da Schwann-Zellen aus neonatalen Tieren besser wachsen. Letztlich wurde der Schwann-Zell-Isolierung aus den Spinalganglien der Vorrang gegeben, da durch diese Methode erheblich mehr Schwann-Zellen isoliert werden konnten. Die isolierten Schwann-Zellen wurden in einem speziellen, serumfreien Schwann-Zell-Medium, supplementiert mit Forskolin und Rinderhypophysenextrakt (Kap. 2.3.1) (modifiziert nach Mauritz *et al.*, 2004) kultiviert. Diese kombinierte Verwendung von Rinderhypophysenextrakt und Forskolin als mitogene Zusätze für ein Schwann-Zell-Medium wurde in der Literatur nicht sehr häufig beschrieben, aber dennoch erfolgreich auch von anderen Arbeitsgruppen (Päiväläinen *et al.*, 2008; Haastert *et al.*, 2007; Porter *et al.*, 1986) eingesetzt.

Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methode zur Kultivierung primärer Schwann-Zellen zeichnete sich durch eine extrem kurze Kultivierungsdauer aus. Innerhalb von nur ca. 7 Tagen konnten diese Schwann-Zellen für Versuche eingesetzt werden. Während der Kulturdauer konnte auf die Zugabe von Mitosegiften zur Reduktion der Fibroblasten verzichtet werden, da die Proliferation der

Fibroblasten in dem serumfreien Schwann-Zell-Medium während der kurzen Kulturzeit unterdrückt wurde. Das spezielle Schwann-Zell-Medium und die zusätzliche proliferations-fördernde Gabe von Forskolin erwiesen sich für die Kultivierung reiner Schwann-Zellen als optimal. Versuche, die Schwann-Zellen durch eine längere Kulturdauer und den damit verbundenen Subkultivierungen zu expandieren, wirkten sich negativ auf den Reinheitsgrad der Schwann-Zell-Kulturen aus. Auch Versuche, die expandierten Schwann-Zellen anschließend mittels Immunopanning (Cheng *et al.*, 1995) oder mittels magnetischer Zellseparation (*Magnetic Cell Sorting with indirect MicroBeads*, MACS) (Vroemen und Weidner, 2003) zu erhöhen, erwiesen sich als eher nachteilig. Zum Einen gingen während dieser Prozeduren sehr viele Schwann-Zellen verloren und zum Anderen konnte auch durch diese Selektionsmethoden kein 100 %-iger Ausschluss von Fibroblasten erreicht werden. Das Problem bei der Kultivierung primärer Schwann-Zell-Kulturen ist, dass Primärkulturen von dissoziierten Nerven und Spinalganglien charakteristischerweise Schwannzellen und Fibroblasten enthalten (Brockes *et al.*, 1979) und, dass die Fibroblasten sehr schwer aus den Kulturen eliminiert werden können.

Um den Schwann-Zell-Anteil in einer Primärkultur zu ermitteln, wurden in der vorliegenden Arbeit die Kulturen hauptsächlich immunzytochemisch phänotypisiert. Bei dieser Methode wurden die Schwann-Zellen mit einem Primärantikörper gegen den als Schwann-Zell-Marker bekannten und von Schwann-Zellen stark exprimierten membrangebundenen Rezeptor $p75^{LNGF}$ (Tan *et al.*, 2003) detektiert. Die nachfolgende Markierung der detektierten Rezeptoren erfolgte Enzym-Substrat-spezifisch mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und dem Chromogen DAB. Diese Färbung ist dauerhaft, was sich bei der Auszählung der zu phänotypisierenden Zellen als vorteilhaft erwies. Bei der Immunfluoreszenzfärbung dagegen wurde die vom Fluoreszenzfarbstoff abgegebene Energie in Form von Licht (Emission) bei jeder Anregung immer schwächer, so dass bei längeren Betrachtungen unter dem Fluoreszenzmikroskop die Präparate verblassten.

4.2 AT₁- und AT₂-Rezeptoren

Ang II wirkt funktionell über die beiden Ang II-Rezeptor-Typen AT₁ und AT₂, die beide als Sieben-Transmembran-Domänen-GPCR klassifiziert wurden (Saito *et al.*, 2008;

Tuccinardi und Martinelli, 2007; Hjorth *et al.*, 1994). Wie zahlreiche Studien belegen, erfolgt die Bindung der Angiotensine hauptsächlich über den N-Terminus der extrazellulären Domäne des GPCR (Heering *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 1995; Hjorth *et al.*, 1994).

Ang II weist eine hohe Bindungsaffinität zu den AT₁- und AT₂-Rezeptoren auf (Daniels *et al.*, 2007; Oro *et al.*, 2007; Schmieder *et al.*, 2007; Saavedra, 2005). Beide Rezeptoren werden in einer Vielzahl von Geweben exprimiert (Elton und Martin, 2007) und bewirken unterschiedliche Ang II-vermittelte Effekte. So ist bekannt, dass alle klassischen Ang II-Wirkungen auf die verschiedenen Organsysteme, wie z. B. das Zellwachstum und die Proliferation, die Freisetzung von Endothelin, Vasopressin und Aldosteron, die Lipidperoxidation, die Expression von Adhäsionsmolekülen, die Produktion von ROS, Antinatriurese, die Senkung des renalen Blutflusses, inklusive Vasokonstriktion, die kardiovaskuläre Hypertrophie und die Senkung des Blutdruckes (Widdop *et al.*, 2008; Dandona *et al.*, 2007; Ferrario, 2006; Unger, 2002; Unger *et al.*, 1996) AT₁-Rezeptor-vermittelt ablaufen. Über den AT₂-Rezeptor dagegen vermittelt Ang II z. B. Vasodilatation, wirkt antiproliferativ, inhibiert Wachstumsprozesse, induziert Apoptose, wirkt natriuretisch, führt zur Freisetzung von NO, ist beteiligt an der Entwicklung und am Schutz neuronalen Gewebes und übt eine wichtige Funktion bei der Zelldifferenzierung und bei axonalen Regenerationsprozessen aus (Widdop *et al.* 2008; Jung *et al.*, 2007; Ferrario, 2006).

4.2.1 Nachweis von Ang II-Rezeptoren

Obwohl bereits Bleul und Mitarbeiter (1995) AT₁- und AT₂-Rezeptoren auf Schwann-Zellen nachwies, wurde in der vorliegenden Arbeit das Vorhandensein dieser Rezeptoren auf den, für die nachfolgenden Versuche eingesetzten Schwannoma-Zellen und primären Schwann-Zellen sowie auf den Spinalganglien-Fibroblasten untersucht. Bei Nagern wird beim AT₁-Rezeptor zwischen den pharmakologisch identischen AT_{1a}-Rezeptoren und den AT_{1b}-Rezeptoren differenziert (Elton und Martin, 2007; von Bohlen und Halbach und Albrecht, 2006; Zhou *et al.*, 2003), welche sowohl bei der Ratte als auch bei der Maus auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind.

In dieser Arbeit wurde der Nachweis von AT_{1a}- und AT₂-Rezeptoren auf den untersuchten Zellen auf allen Ebenen erbracht. So wurde mittels der RT-PCR unter Verwendung von Tier-spezifischen AT_{1a}-, AT_{1b}- und AT₂-Primern die Expression der

Rezeptor-Gene für die AT_{1a}-Rezeptoren (Abb. 3.9 A + B) und für die AT₂-Rezeptoren (Abb. 3.9. C + D) in allen verwendeten Zellarten nachgewiesen. Das PCR-Ergebnis für den AT₂-Rezeptor in Schwannoma-Zellen zeigte allerdings neben einer starken spezifischen Bande (253 bp) auch eine schwache Nebenbande. Es ist möglich, dass diese Nebenbande entstand, weil das eingesetzte AT₂-Rezeptor-Primerpaar sich während eines späteren PCR-Zyklus unspezifisch an einen Genabschnitt anlagerte und dadurch ein weiteres, unerwartetes Produkt amplifiziert wurde. Die Existenz von AT_{1b}-Rezeptoren konnte jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Entweder waren keine mRNA-Transkripte für den AT_{1b}-Rezeptor nachweisbar oder sie lagen weit außerhalb der spezifischen Größenordnung. Mögliche Ursachen hierfür könnten im methodischen Bereich liegen, u. a. sollten die gewählten PCR-Bedingungen und dabei speziell die Anlagerungstemperatur der Primer weiter verifiziert werden. Denkbar ist allerdings auch, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellarten, den AT_{1b}-Rezeptor gar nicht oder nur ganz schwach exprimieren. Da über die AT_{1a}- und AT_{1b}-Rezeptoren aus pharmakologischer Sicht die gleichen Effekte vermittelt werden, wurden in dieser Arbeit keine weiteren, speziellen Versuche unternommen, die AT_{1b}-Rezeptor nachzuweisen. Auf Protein-Ebene wurde mittels immunzytochemischer Färbung (Abb. 3.10) und Western-Blot-Analyse (Abb. 3.14) die Existenz von AT₁- und AT₂- Rezeptoren in Schwannoma-Zellen bestätigt. Mit dem Ang II-Rezeptornachweis auf Schwann-Zellen konnte nun der Fragestellung nachgegangen werden, welchen Einfluss Ang II auf Schwann-Zellen ausübt.

4.3 Stimulation von Schwann-Zellen mit Ang II

Die durchschnittliche physiologische Ang II-Konzentration im venösen Blut von gesunden Erwachsenen wurde von Rossekamp und Kaufmann (1971) mit einer Konzentration von 33 ± 14 pg / ml, also mit $0,03 \pm 0,013$ μ M angegeben. Da es für Nager bislang keine veröffentlichten Angaben zur physiologischen Ang II-Konzentration im Blut zu geben scheint, wurde diese Ang II-Konzentration auch für Nager angenommen.

Für die *in vitro* Versuche der vorliegenden Arbeit wurde, wenn nicht anders angegeben, Ang II einheitlich in einer Konzentration von 1 μ M eingesetzt. Diese Ang II-Konzentration wurde deutlich über dem angenommenen physiologischen Durchschnittswert im Blut bzw. über dem von Bleul und Mitarbeiter (1995)

beschriebenen, endogen von Schwann-Zellen produzierten Ang II (0,00001 μM) gewählt, um damit potentielle Wirkungen von medikamentös eingesetztem Ang II zu untersuchen.

4.4 Einfluss von Ang II auf die Ang II-Rezeptorexpression in Schwann-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels *realtime*-RT-PCR eine signifikante Herabregulation der mRNA-Expression beider Ang II-Rezeptoren in Ang II-stimulierten primären Schwann-Zellen nachgewiesen. Wurden die primären Schwann-Zellen vor der Ang II-Behandlung oxidativ gestresst, so exprimierten sie scheinbar noch weniger Ang II-Rezeptor-mRNA (Abb. 3.11).

Diese Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ließen erkennen, dass die Expressionsrate der Ang II-Rezeptoren auch auf Schwann-Zellen nicht konstant ist und u. a. durch Ang II selbst beeinflusst werden kann. Auch andere Arbeitsgruppen kamen bei der Untersuchung der Ang II-Rezeptorexpression zu ähnlichen Ergebnissen. So wiesen Zhang und Sun (2006), allerdings in Endothelzellen kleiner Lungengefäße der Ratte, nach, dass eine Behandlung mit 1 μM Ang II zu einer Herabregulation der AT_1 -Rezeptor-mRNA und der Rezeptor-Proteine führt und im PNS wurde nach einer Axotomie und nach einer Nervenquetschung eine kurzfristige drastische Heraufregulation der AT_2 -Rezeptor-mRNA in adulten *Nn. ischiadici* von proximal nach distal mit einem anschließenden Expressionsabfall des AT_2 -Rezeptors beobachtet (Gallinat *et al.*, 1998). Da Schwann-Zellen über ein lokales RAS verfügen, ist es denkbar, dass Ang II nach der Nervenverletzung freigesetzt wurde und Rezeptor-vermittelte regenerationsfördernde Effekte von proximal nach distal ausübte. In den primären Schwann-Zell-Kulturen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, war nach 24 Stunden eine Herabregulation der mRNA für den AT_1 - und den AT_2 -Rezeptor sowohl nach einer Ang II-Behandlung als auch nach oxidativem Stress zu beobachten. Diese Resultate könnten ein Hinweis dafür sein, dass sich bei der gewählten Stimulationszeit die mRNAs der Ang II-Rezeptoren bereits in der Phase des Expressionsabfalls befanden. Ein anschließender Western-Blot (Abb. 3.14) zeigte jedoch eine Ang II-vermittelte erhöhte Synthese der AT_1 -Rezeptoren, während die Synthese der AT_2 -Rezeptor-Proteine verringert wurde. Hier besteht die Möglichkeit, dass Expression des AT_2 -Rezeptors durch die

Aktivierung des AT₁-Rezeptors herabreguliert wurde, so wie es Saito und Mitarbeiter (2008) an der mRNA-Expression in PC12-Zellen zeigten. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Western-Blot (Abb. 3.14) gezeigt, dass die Intensität der Protein-Bande für den AT₁-Rezeptor nach einer Simulation mit Ang II zunahm, während gleichzeitig die Intensität der Protein-Bande für den AT₂-Rezeptor abnahm. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur, wonach vieles dafür spricht, dass Ang II über den AT₂-Rezeptor den AT₁-Rezeptor antagonisiert (Gao *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2008; Widdop *et al.* 2008; Wolf *et al.*, 2002; Unger *et al.*, 1996) und wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals auch an Schwann-Zellen gezeigt.

Interessant ist auch, dass Ang II und oxidativer Stress auf die Ang II-Rezeptorexpression der in dieser Arbeit eingesetzten Schwann-Zellen eine fast identische Wirkung auszuüben schienen (Abb. 3.11). Diese Beobachtung kann darauf hindeuten, dass Ang II selbst auch oxidativen Stress in den Schwann-Zellen induzierte, wozu es nach Aussagen verschiedener Arbeitsgruppen geeignet ist (Jung *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2007; Dandona *et al.*, 2006). Einen Aufschluss über die potentielle Beteiligung der Ang II-Rezeptortypen an der Modulation von Schwann-Zell-Funktionen soll im Anschluss geklärt werden. Anzumerken ist noch, dass die Expression der Ang II-Rezeptor-mRNA in den Schwannoma-Zellen von Co-Kulturen prinzipiell vergleichbar mit der Expression in den primären Schwann-Zell-Kulturen war (Abb. 3.13). Auf die Expression der AT_{1a}-Rezeptor-mRNA in Spinalganglien-Fibroblasten hatte oxidativer Stress nur tendenziell einen sehr geringen herabregulierenden und Ang II gar keinen Einfluss. Dahingegen war die Expression der AT₂-Rezeptor-mRNA der Tendenz nach durch Ang II ganz leicht und durch oxidativen Stress etwas stärker erhöht. Demnach verhielten sich Spinalganglien-Fibroblasten nach einer Ang II-Stimulation in Bezug auf die AT₂-Rezeptor-mRNA entgegengesetzt zu Schwann-Zellen, übten jedoch in einer Co-Kultur keinen nennenswerten Einfluss auf die Expression der AT₁- und AT₂-Rezeptor-mRNA in Schwannoma-Zellen aus. In der Literatur gibt es bislang keine Veröffentlichungen zum Einfluss von Ang II auf die Expression der Ang II-Rezeptor-mRNA in Spinalganglien-Fibroblasten. Jedoch beobachteten Dudley und Sommerfelt (1993) in 3T3-Fibroblasten, einer ausschließlich den AT₂-Rezeptor tragenden Maus-Fibroblasten-Zelllinie, dass eine Ang II-Behandlung dosis- und zeitabhängig die Anzahl der AT₂-Rezeptoren erhöhte. Dabei wurde der höchste Wert nach

24 Stunden mit einer Ang II-Konzentration von 1 μ M erreicht. Li *et al.* (1999) beobachteten eine verstärkte AT₂-Rezeptor-Protein-Synthese in 3T3-Fibroblasten nach einer 48-stündigen Ang II-Behandlung, konnten aber keine erhöhte AT₂-Rezeptor-mRNA mehr nachweisen. Sie vermuteten, dass eine Regulation des AT₂-Rezeptors durch Ang II in den 3T3-Fibroblasten über eine erhöhte Translationsrate der AT₂-Rezeptor-mRNA vermittelt wurde. Ob diese Aussagen auch für die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Spinalganglien-Fibroblasten zutreffen, ist nicht bekannt.

4.5 AT₁- und AT₂-Rezeptor-vermittelte Effekte von Ang II

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl AT₁- als auch der AT₂-Rezeptoren auf Schwann-Zellen nachgewiesen, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass Ang II über beide Rezeptortypen modulierend auf Schwann-Zellen einwirken kann.

4.5.1 Einfluss von Ang II auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B

NF- κ B ist im NS u. a. an neuroprotektiven Prozessen beteiligt (Widera *et al.*, 2006b; Kaltschmidt *et al.*, 2005) und deshalb für die Untersuchung von neuroregenerativen Signalwegen interessant. In Säugern existiert NF- κ B entweder als Homo- oder als Heterodimer, bestehend aus den fünf verschiedenen Untereinheiten: Rel-A (p65), Rel-B, c-Rel, p50 und p52 (Nickols *et al.*, 2003). Inaktiviert ist NF- κ B nicht-kovalent mit inhibitorischen Proteinen der κ B-Familie assoziiert und im Zytoplasma lokalisiert. Wird NF- κ B aktiviert, so werden diese inhibitorischen Proteine phosphoryliert und zerstört, so dass NF- κ B freigesetzt werden kann (Karin und Ben-Neriah, 2000). Dann erst kann NF- κ B durch eine Translokation der beiden p50 / p65 Untereinheiten in den Zellkern, an bestimmte DNA-Abschnitte binden und dadurch die Transkription von Genen beeinflussen. Ang II kann über beide Ang II-Rezeptoren den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren und damit beispielsweise Entzündungsreaktionen initiieren und verstärken (Dandona *et al.*, 2007; Ferrario, 2006; Esteban *et al.*, 2005). Ein möglicher Zusammenhang von Ang II-Wirkung und NF- κ B-Aktivierung wurde daher in der vorliegenden Arbeit an Schwannoma-Zellen überprüft.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass in Schwannoma-Zellen der Transkriptionsfaktor NF- κ B durch eine Ang II-Gabe aktiviert werden kann. So wurde auf Protein-Ebene mittels immunzytochemischer Färbung der Untereinheit p65 gezeigt, dass NF- κ B in den unstimulierten Schwannoma-Zellen hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist, während nach einer Ang II-Stimulation große Mengen von NF- κ B im Zellkern zu detektieren waren (Abb. 3.15). Mittels EMSA wurde bestätigt, dass eine Ang II-Gabe die NF- κ B-Proteine im Zellkern von Schwannoma-Zellen erhöhte (Abb. 3.16). Diese Ergebnisse bestätigten die Studien anderer Arbeitsgruppen die zeigten, dass in humanen Schwann-Zellen zwei verschiedene NF- κ B-Komplexe aktiviert und reguliert werden (Laura *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2005). Die Aktivierung von NF- κ B kann durch verschiedene extrazelluläre Stimulie, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und bakterielle oder virale Infektionen (Hoffmann *et al.*, 2006; Perkins und Gilmore, 2006; Sun und Andersson, 2002), aber auch durch ROS (Karin und Ben-Neriah, 2000) erfolgen. Eine Aktivierung von NF- κ B durch Ang II ist über einen gemeinsamen Signalweg sowohl AT₁-Rezeptor- als auch AT₂-Rezeptor-vermittelt möglich. Um zu klären, ob in den untersuchten Schwannoma-Zellen die NF- κ B-Aktivierung ebenfalls über beide Rezeptorsubtypen erfolgte, wurden die Kernproteine von stimulierten und unstimulierten Schwannoma-Zellen in einem EMSA auf das Vorkommen von NF- κ B-Proteinen untersucht. Die Kernproteine aus den Ang II-behandelte Schwannoma-Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine stärkere Bande für NF- κ B. Die Bandenintensität nahm jedoch noch weiter zu, wenn die Schwann-Zellen gleichzeitig mit Ang II und dem AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan behandelt wurden (Abb. 3.16). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass NF- κ B in Schwann-Zellen nach einer Ang II-Gabe stärker über den AT₂-Rezeptor als über den AT₁-Rezeptor aktiviert wurde. Infolge einer Aktivierung von NF- κ B können verschiedene Signaltransduktionswege in Gang gesetzt werden. Um genaue Aussagen zu den Ang II - NF- κ B-vermittelten Signalkaskaden in Schwann-Zellen treffen zu können, bedarf es noch weiterer Aufklärungen.

Der Nachweis einer durch Ang II induzierbaren Aktivierung von NF- κ B nimmt bei der Erklärung der neuroregenerationsfördernden Eigenschaften von Ang II eine wichtige Stellung ein. So ist in Schwann-Zellen NF- κ B für die Induktion der peripheren Myelinbildung (Yoon *et al.*, 2008; Nickols *et al.*, 2003) erforderlich. Weiterhin ist NF- κ B an der Auslösung der Schwann-Zell-Differenzierung und an der Regulation

der Zytokinproduktion beteiligt (Mattson und Meffert, 2006; Mattson, 2003; Nickols *et al.*, 2003). Eine Möglichkeit die NF- κ B-Aktivierung in Schwann-Zellen durch Ang II zu erklären und zu diskutieren, wäre auch in der Eigenschaft von Ang II als potentielltem Auslöser von oxidativem Stress (Jung *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2007; Dandona *et al.*, 2006) zu sehen, denn ROS können NF- κ B ebenfalls aktivieren (Karin und Ben-Neriah, 2000). So zeigten Hiroji Uemura *et al.* (2008), dass Ang II in Karzinomzellen der Prostata die Expression von Proteinen, die mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden (p47phox, Mangan-Superoxiddismutase 2, Glutathionperoxidase), herauf regulierte. Dieser Effekt konnte durch eine Vorinkubation der Zellen mit einem AT₁-Rezeptorblocker oder mit dem Enzym Katalase inhibiert werden (Hiroji Uemura *et al.* 2008). Das Enzym p47phox ist für die korrekte Funktion des NADPH-Oxidase-Komplexes bei der Bildung von ROS in Phagozyten verantwortlich (Wahn *et al.*, 2004). Da Schwann-Zellen ebenfalls über die Fähigkeit zur Phagozytose verfügen, könnte eine Beeinflussung dieses Enzymkomplexes durch Ang II in den Schwann-Zellen stattgefunden haben. Die Bildung von ROS wird hauptsächlich über den AT₁-Rezeptor vermittelt, jedoch zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine deutlich stärkere Präsenz von NF- κ B im Zellkern nach einer AT₁-Rezeptor-Blockade durch Losartan (Abb. 3.16). Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass Ang II in Schwann-Zellen sowohl AT₁- als auch AT₂-Rezeptor-vermittelt den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren kann, die Aktivierung nach Ang II-Stimulation jedoch stärker über den AT₂-Rezeptor erfolgte. Während der AT₁-Rezeptor mehr an Vorgängen beteiligt zu sein scheint, die auch während einer Waller-Degeneration ablaufen, so werden über den AT₂-Rezeptor eher neuroregenerative Prozesse vermittelt. So zeigten Lucius und Mitarbeiter (1998), dass Ang II über den AT₂-Rezeptor axonale Regenerationsprozesse vermittelt und als neurotropher Faktor für die Neurone des ZNS *in vivo* und *in vitro* agieren kann.

Mit anschließenden Versuchen sollte geklärt werden, ob mögliche Ang II-induzierte Prozesse in Schwann-Zellen gegebenenfalls über eine NF- κ B-Signalkaskade in Gang gesetzt wurden.

4.5.2 Beeinflussung der Zellproliferation in Schwannoma-Zellen, primären Schwann-Zellen und Spinalganglien-Fibroblasten durch Ang II

Eine Aktivierung von NF- κ B kann in Schwann-Zellen Dedifferenzierungsvorgänge auslösen. Damit verbunden ist die Umwandlung der differenzierten Schwann-Zellen zu regenerationsfördernden Schwann-Zellen, die proliferieren und Wachstumsfaktoren sezernieren (Fansa und Keilhoff, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass Ang II proliferationsfördernd auf Schwann-Zellen wirkt (Abb. 3.17 und Abb. 3.19) und, dass dieser Prozess durch AT₁- und AT₂-Rezeptorantagonisten beeinflussbar ist (Abb. 3.20 und Abb. 3.21). Während die Ang II-vermittelte Proliferationssteigerung in den Schwann-Zellen durch eine Blockade des AT₁-Rezeptors mit Losartan der Tendenz nach reduziert wurde, erhöhte eine AT₂-Rezeptor-Blockade mit PD123319 die Proliferation der Schwann-Zellen noch stärker, als Ang II allein (Abb. 3.21). Diese Befunde sprechen dafür, dass das applizierte Ang II über beide Rezeptortypen proliferationssteigernd wirken konnte, nach AT₂-Rezeptorblockade jedoch vermehrt dem AT₁-Rezeptor zur Verfügung stand, so dass dessen Eigenschaften und Einflüsse dominierten. Über den AT₁-Rezeptor wird bekanntermaßen die Zellproliferation stärker vermittelt, während dem AT₂-Rezeptor antiproliferative Eigenschaften zugesprochen werden (Ferrario, 2006; Unger, 2002). Da aber auch eine Beteiligung des AT₂-Rezeptors an Proliferationsvorgängen, wie z. B. in Leber-Fibroblasten (Jun *et al.*, 2008) oder in Nieren-Zellen (Cao *et al.*, 2000) nachgewiesen wurde, korrelieren diese Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten in Bezug auf die Proliferationsvermittlung über den AT₂-Rezeptor mit Angaben aus der Literatur. Interessanterweise hatte die stärkste proliferationssteigernde Wirkung auf Schwannoma-Zellen der AT₁-Rezeptorblocker Losartan allein. Auch PD123319 allein als Antagonist des AT₂-Rezeptors führte tendenziell zu einer leichten Proliferationssteigerung, die aber in Anbetracht der proliferationserhöhenden Potentiale der anderen Stimulanzien hier nicht weiter diskutiert werden soll und wahrscheinlich vernachlässigbar ist (Abb. 3.20).

Experimente einer anderen Arbeitsgruppe (Sun *et al.*, 2008) zeigten an endothelialen glatten Muskelzellen, dass Autoantikörper gegen den AT₁-Rezeptor ebenfalls Proliferationsvorgänge induzieren können. Allerdings wurde diese Proliferationssteigerung durch eine Co-Stimulation mit Losartan wieder unterdrückt, so dass hierin kein allgemeiner Diskussionsansatz für die proliferationssteigernde Wirkung von AT₁-Rezeptorantagonisten gefunden werden kann. Losartan ist ein

nichtpeptiderger kompetitiver AT₁ II-Rezeptorantagonist (Hunyady, 1996), weshalb die, in der vorliegenden Arbeit analysierte Losartan-induzierte Steigerung der Schwann-Zell-Proliferation möglicherweise auch rezeptorunabhängig erfolgt sein kann.

Vergleichend wurde erstmalig auch der Einfluss von Ang II auf die Proliferation von Spinalganglien-Fibroblasten untersucht. Entgegen den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, wonach Ang II in den Fibroblasten anderer Gewebe eine Proliferationssteigerung initiierte (Jun *et al.*, 2008; Hattori *et al.*, 2007; Ohuchi *et al.*, 2004), hatte Ang II in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die Proliferation von Spinalganglien-Fibroblasten (Abb. 3.18). Denkbar ist, dass die gewählten Versuchsbedingungen in serumarmen Medium die Proliferation in den Fibroblasten zum Erliegen brachte. Weitaus interessanter ist aber die Möglichkeit, dass die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Co-Expression der AT₁- und AT₂-Rezeptoren in Spinalganglien-Fibroblasten (Abb. 3.9 A + C) mit einer Resistenz gegen Ang II einhergehen könnte, so wie es Galindo und Mitarbeiter (2005) in humanen Haut-Fibroblasten beobachteten. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls erstmals Untersuchungen zur Einflussnahme von Spinalganglien-Fibroblasten auf das Proliferationsverhalten Ang II-stimulierter Schwannoma-Zellen durchgeführt. Schwann-Zellen und Fibroblasten sind *in vivo* eng assoziiert, weshalb diese Untersuchungen an Co-Kulturen vorgenommen wurden. Auf die Co-Kulturen hatte Ang II den gleichen proliferationssteigernden Einfluss wie auf die Schwann-Zell-Kulturen. Wird von den Ergebnisse der vorangegangenen Proliferations-Experimenten ausgegangen, ist dieses Ergebnis gut erklärbar. Die Spinalganglien-Fibroblasten blieben auch in Co-Kulturen von Ang II unbeeinflusst, während die Schwann-Zellen in diesen Kulturen nach einer Ang II-Stimulation ihre Proliferation signifikant erhöhten.

4.5.3 Einfluss von oxidativem Stress auf Ang II-stimulierte primäre Schwann-Zellen und Fibroblasten

Ang II spielt eine Rolle bei der Induktion von oxidativem Stress (Shao *et al.*, 2007). Um festzustellen, ob eine Behandlung mit Ang II und mit einem Auslöser von oxidativem Stress (H₂O₂) denselben Effekt auf das Proliferationsverhalten der in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen bewirkt, wurden Untersuchungen dazu an Schwann-Zellen, Spinalganglien-Fibroblasten und Co-Kulturen durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass sowohl Ang II als auch oxidativer Stress die Schwann-Zellen zur Proliferation anregen können, wobei Ang II einen deutlich höheren proliferationsfördernden Einfluss auf die Schwann-Zellen als oxidativer Stress ausübte. Dieser proliferationssteigernde Effekt von Ang II wurde um etwa die Hälfte reduziert, wenn die Schwann-Zellen vor der Ang II-Gabe oxidativ gestresst wurden (Abb. 3.17). Auf die Proliferation der untersuchten Spinalganglien-Fibroblasten übte weder Ang II noch oxidativer Stress einen Einfluss aus (Abb. 3.20). Dahingegen hatten Ang II und oxidativer Stress auf die Co-Kulturen eine ähnliche Wirkung wie auf die Schwann-Zell-Kulturen. Die Proliferation der Zellen aus den Co-Kulturen war durch eine H₂O₂-Behandlung leicht und durch eine Ang II-Behandlung signifikant erhöht. Durch eine zusätzliche Gabe von H₂O₂ wurde die Ang II-vermittelte Proliferationssteigerung signifikant gesenkt (Abb. 3.19).

Im Zusammenhang betrachtet lassen diese Untersuchungen zum Einfluss von Ang II und H₂O₂ auf die Zellproliferation darauf schließen, dass sowohl Ang II als auch oxidativer Stress in den Schwann-Zellen die Proliferation steigerten. Allerdings war die proliferationsfördernde Wirkung von Ang II um annähernd das Doppelte höher und wurde durch eine Behandlung mit H₂O₂ wieder deutlich gesenkt. Als Vertreter der ROS kann H₂O₂ als ein wichtiges Signalmolekül zur Regulation verschiedener zellulärer Prozesse (Yung *et al.*, 2006; Griendling *et al.*, 2000) eine bedeutende physiologische Rolle bei der Zellproliferation spielen, wie es auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten (Abb. 3.17 und Abb. 3.19). ROS werden unter physiologischen Bedingungen ständig vom Organismus gebildet, wie beispielsweise bei metabolischen Prozessen, bei der Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren oder um das Überleben der Zellen zu erhalten (Meng *et al.*, 2002; Griendling *et al.*, 2000). Aber auch unter pathophysiologischen Bedingungen, wie sie z. B. während einer Entzündungsreaktion, bei Gewebeverletzungen oder Infektionen zu finden sind, werden ROS gebildet (Yao *et al.*, 2006; Yung *et al.*, 2006; Sorescu und Griendling, 2002). Aufgrund der vorliegenden Literaturdaten könnte es einen Zusammenhang zwischen ROS und Neuroregeneration geben, allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen, um dieses zu bestätigen. In der vorliegenden Arbeit wurden Schwann-Zellen mit einer relativ niedrigen Dosis des oxidativen Stressauslösers H₂O₂ behandelt. Diese H₂O₂-Konzentration fügte den Zellen keinen Schaden zu, wie Vorversuche (ohne Abb.) sowie die H₂O₂-induzierte Proliferation (Abb. 3.17 und 3.19) bestätigten. Es ist denkbar, dass ein erhöhter H₂O₂-Spiegel den Schwann-Zellen die

Situation einer ablaufenden Entzündungsreaktion 'suggerierte', so wie sie auch bei der Waller-Degeneration nach einer Nervenverletzung stattfindet. Die Schwann-Zellen begannen daraufhin zu proliferieren, um in ausreichender Zellzahl zur Phagozytose des Myelinabfalles zur Verfügung zu stehen. Aller Wahrscheinlichkeit nach besitzen Schwann-Zellen als phagozytierende Zellen sogar selbst die Fähigkeit, H_2O_2 zu produzieren und freizusetzen, um z. B. den Myelinabfall abzubauen. Die proliferationssenkende Wirkung von H_2O_2 auf Ang II-stimulierte Schwann-Zellen könnte im Hinblick auf eine periphere Nervenregeneration folgendermaßen erklärbar sein: Die beiden Stimulanzen H_2O_2 und Ang II könnten Einfluss auf unterschiedliche Phasen während der stattfindenden Prozesse nach einer peripheren Nervenverletzung haben. So könnte die Schwann-Zellen sich nach einer 24-stündigen Behandlung mit Ang II in der Phase zur Bildung der 'Büngnerschen Bänder' befunden haben, was die starke Proliferation nach Ang II-Gabe erklären würde. Eine Gabe von H_2O_2 zu Ang II-stimulierten Schwann-Zellen dagegen könnte in den Zellen wieder die Situation einer stattfindenden Entzündungsreaktion 'suggeriert' haben, woraufhin diese ihre funktionellen Prioritäten von der Proliferation auf die Beteiligung an den Entzündungsprozessen (Kap. 1.3.1) geändert haben könnten.

Um diese Vermutungen zu bestätigen bedarf es allerdings noch weiterer Untersuchungen. Ein interessanter Ansatzpunkt wäre der direkte Vergleich der Phagozytoseaktivität von oxidativ gestressten und Ang II-behandelten Schwann-Zellen.

4.5.4 Einfluss von Ang II auf die Expression der NGF-mRNA und auf die Freisetzung von NGF

Die Anwesenheit von neurotrophen Faktoren ist für eine erfolgreiche Nervenregeneration essentiell. Während einer peripheren Nervenregeneration oder der Myelinisierung bilden Schwann-Zellen verschiedene neurotrophe Faktoren und deren Rezeptoren (Byun *et al.*, 2008). Da NGF der zuerst beschriebene und am besten charakterisierte Nervenwachstumsfaktor ist (Byun *et al.*, 2008), wurde in der vorliegenden Arbeit die Produktion neurotropher Faktoren am Beispiel von NGF an Ang II-stimulierten Schwann-Zellen untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine leichte tendenzielle Erhöhung der NGF-mRNA-Expression und eine signifikant gesteigerte Freisetzung von NGF nach einer Stimulation durch Ang II in Schwann-Zellen gezeigt werden (Abb. 3.22 und Abb. 3.23). Die Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen auf mRNA- und Protein-Ebene könnte mit der Translation zu erklären sein. Es ist denkbar, dass der gewählte Stimulationszeitraum von 24 Stunden für den Nachweis von NGF auf mRNA-Ebene einfach zu lang und die mRNA bereits größtenteils in Protein umgeschrieben war. Um hier zu einer soliden Aussage zu kommen, müssen weitere Versuche mit variablen Stimulationszeiten folgen. Jedoch wäre hierin auch eine Erklärung für die nachgewiesene signifikante NGF-Erhöhung auf Protein-Ebene zu sehen.

NGF kann als Wachstumsfaktor aufgrund spezifischer Wechselwirkung mit seinen beiden Rezeptoren $p75^{\text{LNGF}}$ und TrkA u. a. die Zellproliferation und Zelldifferenzierung initiieren, und auch eine Induktion von Myelinisierungsprozessen wird NGF zugeschrieben (Byun *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2006; Sherman und Brophy, 2005). Das Signal zur Heraufregulation der Myelinisierung kommt dabei vom Axon als Antwort auf die Bindung von NGF an den axonalen TrkA-Rezeptor (Sherman und Brophy, 2005). Über den $p75^{\text{LNGF}}$ -Rezeptor dagegen wird als neuroregenerativer Effekt die axonale Elongation nach Nervenverletzung vermittelt (Zorick und Lemke, 1996). Neuronale Zellkulturen veränderten NGF-Dosis-abhängig die Expression des AT_2 -Rezeptors (Huang *et al.*, 1997). Das deutet darauf hin, dass es in diesen Zellen Interaktionen von NGF mit dem AT_2 -Rezeptor und demzufolge wahrscheinlich auch mit Ang II gab.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikanter Anstieg von NGF im Zellkulturüberstand nach Ang II-Gabe gemessen. Das ist ein Indiz dafür, dass Ang II im PNS regenerationsfördernd über eine Induktion der NGF-Ausschüttung in Schwann-Zellen wirken kann. Es ist seit längerem bekannt, dass Schwann-Zellen NGF ausschütten, um damit ein neurotrophes Milieu für neuroregenerative Prozesse zu schaffen (Evans, 2000; Fu und Gordon, 1997; Araki und Milbrandt, 1996), doch in dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass Schwann-Zellen durch Ang II zur NGF-Freisetzung stimuliert werden können. Damit wurde u. a. eine weitere Erklärung für die Ang II-induzierte Proliferation der Schwann-Zellen gefunden, denn NGF kann auch autokrin wirken (Byun *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2003).

4.5.5 Einfluss von Ang II auf die Freisetzung von NO

Die induzierbare Isoform der NO-Synthase (iNOS) produziert NO aus L-Arginin als Antwort auf entzündungsauslösende Stimuli. NO ist an der Vermittlung von Zytotoxizität beteiligt, löst Nekrose und Apoptose aus, ist aber auch in neuroprotektive Mechanismen involviert (Conti *et al.*, 2004), indem es als *second messenger* über den regenerationsfördernden AT₂-Rezeptor Signaltransduktionswege moduliert.

Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Ang II auf die Freisetzung von NO untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass Schwann-Zellen mRNA für die iNOS exprimieren (Abb. 3.26) und, dass Schwannoma-Zellen nach einer Stimulation mit TNF- α und IFN- γ signifikant zur NO-Freisetzung stimuliert werden können (Abb. 3.25). Allerdings konnte keine NO-Produktion nach Stimulation mit Ang II in diesen Zellen detektiert werden. Das bedeutet, dass Ang II in Schwannoma-Zellen nicht an der Freisetzung von NO beteiligt ist, was wiederum als ein regenerationsfördernder Effekt von Ang II gesehen werden kann, weil Ang II somit nicht an der NO-induzierten Vermittlung von Zytotoxizität, Nekrose und Apoptose beteiligt sein kann. Möglicherweise fungiert Ang II sogar selbst als Antagonist für Entzündungsmediatoren.

4.5.6 Einfluss von Ang II auf die Induktion von Apoptose

Schwann-Zellen sind an der Neuroregeneration im PNS beteiligt. Allerdings werden überschüssige Schwann-Zellen nach Abschluss dieser Prozesse durch Apoptose beseitigt. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Ang II auf die Induktion von Apoptose in Schwann-Zellen geprüft werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Ang II keinen Einfluss auf die Induktion von Apoptose ausübt. Die untersuchten Zellen wiesen intakte DNA auf (Abb. 3.2.7), zudem war die Morphologie der Zellen nach einer Ang II-Gabe unverändert (ohne Abb). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den in dieser Arbeit erbrachten Befunden, wonach Ang II in den Schwannoma-Zellen den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivierte und möglicherweise dadurch in den Zellen Proliferation und die Freisetzung von NGF, somit also regenerative und nicht zerstörerische Effekte induzierte. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass Ang II durch seine Beteiligung an neuroregenerativen Prozessen eine wichtige Rolle im PNS spielen kann.

4.6 Einfluss von Ang II auf die funktionelle Regeneration peripherer Nerven *in vivo*

4.6.1 Ang II induzierte *in vivo* eine erhöhte GAP-43-Expression im distalen Nervensegment

Im PNS wird GAP-43 in adulten Säugern von regenerierenden Nervenfasern exprimiert und induziert hier das Wachstum neuer Axone. Aus diesem Grund ist GAP-43 ein geeignetes Markerprotein für die Darstellung regenerierender Nervenfasern (Schicho *et al.*, 1999; Meiri *et al.*, 1988).

In der vorliegenden Arbeit konnte GAP-43 in allen Untersuchungsgruppen (Kontrollgruppe, 'Ang II-Gruppe', 'Ang II / PD123319-Gruppe', 'Ang II / Losartan-Gruppe') detektiert werden (Abb. 3.28 A-B). Es gab jedoch deutliche Unterschiede in der Intensität, mit der die GAP-43-positiven Axone angefärbt wurden. Die DAB-Färbungen der GAP-43-positiven Axone in der 'Ang II-Gruppe' (Abb. 3.28 B) und in der 'Ang II / Losartan-Gruppe' (Abb. 3.28 D) waren mit Abstand höher als die der anderen Untersuchungsgruppen. Dieses Ergebnis zeigte, dass alle untersuchten *Nn. ischiadici* am 21. Tag nach der Läsion GAP-43 exprimierten und sich somit im Prozess der axonalen Regeneration befanden. Diese Aussage wurde auch durch die Beobachtung unterstützt, dass die Wachstumskegel der neuaussprossenden Axone aller Untersuchungsgruppen nicht mehr sichtbar waren, weil die regenerierenden Axone bereits die Quetschläsionsstellen überwunden hatten (Abb. 3.28 A-D). Es ist vorstellbar, dass die proximal neuangesprossenen Axone aller Untersuchungsgruppen am 21. Tag nach der Läsion bereits an dem 10 mm distal von der Läsionsstelle entfernten Nervensegment angeknüpft hatten, da die axonale Regenerationsgeschwindigkeit, im Idealfall ca. 1,0 - 1,45 mm / Tag beträgt (Lüllmann-Rauch, 2006).

Jedoch gab es Unterschiede in der Farbintensität der GAP-43 - DAB-gefärbten Axone zwischen einigen Untersuchungsgruppen. Unter der begründeten Annahme, dass diese Farbintensitätsunterschiede in direktem Zusammenhang mit der Anzahl der detektierten GAP-43-Proteine stehen, kann folgendes Fazit gezogen werden: Ang II induzierte *in vivo* eine verstärkte Expression des Proteins GAP-43 in den gequetschten *Nn. ischiadici* (Abb. 3.28.B), welche durch die gleichzeitige Behandlung mit dem AT₂-Rezeptorantagonisten PD123319 blockiert werden konnte (Abb. 3.28 C). Eine Blockade des AT₁-Rezeptors mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten

Losartan inhibierte dagegen die Ang II-induzierte starke GAP-43-Expression nicht (Abb. 3.28 D). Da der Proteingehalt an GAP-43 proportional mit der Anzahl der regenerierten Axone korreliert (van der Zee *et al.*, 1989), wird deutlich, dass Ang II axonale Regeneration auch im PNS induzieren kann und, dass dieser Prozess AT₂-Rezeptor-vermittelt abläuft (Kap. 1.3.4).

Das Axon einer Nervenzelle besteht aus zahlreichen längsgebündelten Mikrotubuli und Aktinfilamenten. Es wird durch das Axolemm begrenzt und von Schwann-Zellen umhüllt. Axon und Schwann-Zelle bilden im PNS eine Einheit und werden auf der gesamten Axonlänge von einer gemeinsamen Basalmembran umgeben. Voraussetzung für eine erfolgreiche Nervenregeneration ist die Unversehrtheit dieser Basalmembran.

Wie es die erhöhte GAP-43-Expression zeigte, war in allen Untersuchungsgruppen nach einer Quetschung des *N. ischiadicus* eine Nervenregeneration möglich. Demzufolge war die Basalmembran noch intakt, und es stellte sich die Frage, über welche Zielzellen Ang II seinen neuroregenerationsfördernden Einfluss nach der *N. ischiadicus*-Läsion ausübte. Wie in Kap. 1.3.1 beschrieben, setzt eine Nervenläsion zunächst den Ablauf einer Waller-Degeneration in Gang, bevor neuroregenerative Ereignisse stattfinden. An beiden Prozessen sind Schwann-Zellen aktiv beteiligt (Kap. 1.3.1 und 4.1), womit es sehr wahrscheinlich ist, dass Ang II modulierend auf die Funktionen dieser Zellen wirkte.

4.6.2 Ang II induzierte *in vivo* eine beschleunigte Remyelinisierung

Nach erfolgreichem Auswachsen der Axone und der Wiederherstellung der synaptischen Kontakte der Nervenzelle, wird das Axon erneut von den Schwann-Zellen myelinisiert.

Zur Unterstützung der Aussage, dass Ang II über eine Modulation von Schwann-Zellfunktionen positiv auf neuroregeneratorische Prozesse wirken kann, wurde als weiteres *in vivo*-Experiment der Myelinisierungsgrad der verletzten *Nn. ischiadici* in allen Untersuchungsgruppen am 21. Tag nach der Läsion an Semi-Dünnschnitten untersucht. Die Ergebnisse zeigt Abb. 3.28 a-d).

Lichtmikroskopisch war eine deutlich sichtbare Zunahme von Anzahl und Durchmesser der myelinisierten Axone von Ang II-behandelten Nerven sichtbar (Abb. 3.28 b). Somit bestätigten die Untersuchungsergebnisse, dass Ang II *in vivo*

beschleunigend auf die Remyelinisierung verletzter Nervenfasern wirkt. Dieser Effekt konnte durch die gleichzeitige Behandlung mit dem AT₂-Rezeptorantagonisten PD123319 unterbunden werden (Abb. 3.28 c), während der AT₁-Rezeptorantagonist Losartan den positiven Effekt von Ang II nicht blockieren konnte (Abb. 3.28 d). Daraus lässt sich schließen, dass Ang II seinen positiven Effekt auf die Myelinisierung verletzter Axone auch hier über den AT₂-Rezeptor vermittelte.

Eine zusammenfassende Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit experimentell nachgewiesene regenerationsfördernde Wirkung von Ang II *in vitro* und *in vivo* ist wie folgt denkbar: Nach der peripheren Nervenverletzung unterlag zunächst der distale Nervenstumpf der Waller-Degeneration. Ang II stimulierte dabei die in der intakten Basallamina verbliebenen Schwann-Zellen zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine und beschleunigte damit zunächst den Ablauf der Waller-Degeneration. In der sich anschließenden Regenerationsphase regte Ang II die Schwann-Zellen zur schnelleren Proliferation (Abb. 3.17, Abb. 3.19, Abb. 3.20 und Abb. 3.21) und zur verstärkten Freisetzung neurotropher Faktoren (Abb.3.23) an. Die dafür nötige Aktivierung der Schwann-Zellen erfolgte über den AT₂-Rezeptor und einer nachfolgenden Einschaltung des regenerationsfördernden NF-κB-Signalweges (Abb. 3.15 und Abb. 3.16). Damit war es den Schwann-Zellen möglich, sich schneller zu 'Büngnerschen Bändern' zu formieren und den proximal neuauswachsenden Axonen als Leitschienen zu dienen. Unterstützt durch Schwann-Zell-sezernierte Neurotrophine und durch Ang II selbst wurde das Wachstum der regenerierenden Axone beschleunigt, so dass sie bereits nach 21 Tagen an das distale Nervensegment anknüpft hatten. Experimentell war dieses verstärkte axonale Wachstum an der erhöhten GAP-43-Expression nachzuweisen (Abb. 3.28 A-D). Zusätzlich zu einer Beschleunigung der Regeneration wurde eine funktionelle Wiederherstellung der Nervenfasern infolge der Ang II-Behandlung bereits 21 Tage nach der Läsion auch dadurch erreicht, dass die Axone erneut und beschleunigt von Schwann-Zellen myelinisiert wurden (Abb. 3.28 a-d).

5 Zusammenfassung

Im Gegensatz zum zentralen Nervensystem besitzt das periphere Nervensystem die Fähigkeit, zu regenerieren und die ursprünglichen Verbindungen wieder herzustellen. Dabei werden dem Peptidhormon Angiotensin II neuroregenerationsfördernde Eigenschaften zugeschrieben, da es nachweislich die funktionelle Regeneration peripherer Nerven beschleunigen kann. An neuroregenerativen Verläufen im peripheren Nervensystem sind die Schwann-Zellen essentiell beteiligt. Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welche zellbiologischen Funktionen Angiotensin II in permanenten und / oder primären Schwann-Zellen im Hinblick auf eine positive Beeinflussung von neuroregenerativen Prozessen moduliert.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde eine Methode zur Präparation und Kultivierung primärer Ratten-Schwann-Zellen etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass Schwann-Zellen Angiotensin II-Rezeptoren vom Typ 1 und Typ 2 tragen und, dass deren Expression durch Angiotensin II beeinflusst wird. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Angiotensin II in Schwann-Zellen den Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Zellkern transloziert. Dieser Effekt steht höchstwahrscheinlich im direkten Zusammenhang mit dem erstmals in dieser Arbeit gezeigten Angiotensin II-vermittelten Anstieg vom Nervenwachstumsfaktor (NGF) im Kulturüberstand von Schwann-Zellen. Unter dem Einfluss von Angiotensin II wurde auch die Proliferation der Schwann-Zellen gesteigert. Ferner wurde nachgewiesen, dass Angiotensin II weder eine Produktion von NO noch Apoptose in den Schwann-Zellen induzierte.

Histologische Untersuchungen an gequetschten *Nn. ischiadici* der Ratte ergaben, dass eine *in vivo* Gabe von Angiotensin II den Regenerationsprozess morphologisch positiv beeinflusste. Mit einer Färbung des Markerproteins für neuaussprossende Axone (GAP-43) und einer Myelinscheiden-Färbung wurde untermauert, dass Angiotensin II *in vivo* die Regeneration der verletzten Nerven unterstützte.

Mit den hier geschilderten Ergebnissen wurde gezeigt, dass Angiotensin II durch eine funktionelle Modulation der Schwann-Zellen die Regeneration verletzter Nervenfasern fördern kann. Unter dem Einfluss von Angiotensin II wurde in den Schwann-Zellen AT₂-vermittelt NF- κ B aktiviert, woraus eine erhöhte Freisetzung von NGF, verbunden mit axonalem Neuwachstum und einer Induktion zur erneuten Myelinisierung der regenerierten Axone resultieren kann.

Die Befunde dieser Arbeit geben Anlass für weitere Untersuchungen zum lokalen therapeutischen Einsatz von Angiotensin II und / oder der lokalen Applikation von AT₁-Rezeptorblockern nach einer peripheren Nervenverletzung.

6 Summary

In contrast to the central nervous system the peripheral nervous system is able to regenerate from injury and can recover primary connections. The peptide hormone Angiotensin II promotes neuro-regenerative processes *in vivo* because it accelerates functional recovery of crushed peripheral nerves as has been proved in animal models.

Schwann cells are essential to participate in neuro-regenerative processes in the peripheral nervous system. For this reason this work is focussing on cellular functions of Angiotensin II on stable and / or primary Schwann cell cultures which may modulate neuro-regenerative processes in a positive manner.

Within the scope of these investigations a method for preparation and cultivation of rat primary Schwann cells was established. It was shown *in vitro* that Schwann cells produce both Angiotensin II receptors: AT₁ and AT₂, and these expressions can be modulated by Angiotensin II itself. Moreover, Angiotensin II stimulation induced the translocation of the transcription factor NF-κB to the nucleus which is probably related to an increased production of nerve growth factor (NGF). Angiotensin II stimulation lead also to a significant enhancement of proliferation. Neither production of nitric oxide (NO) nor apoptosis was induced upon Angiotensin II stimulation.

Histomorphologic analysis of crushed rat *Nervi ischiadici* manifested the positive influence of Angiotensin II on processes of regeneration *in vivo*. Immunolabeling of a marker protein for new sprouted nerve fibres (GAP-43) and paraphenylene-diamine-staining of myelin sheets confirmed the hypothesis, that Angiotensin II supports recover of peripheral nerves after injury.

The results of this work demonstrate that Angiotensin II-induced modulation of Schwann cell functions can promote axonal regeneration. It was shown, that the activation of NF-κB upon Angiotensin II stimulation was mediated by the AT₂-receptor, which resulted in an increased secretion of NGF combined with axonal outgrow and induction of re-myelination.

The findings of this work encourage to further investigate the local therapeutic application of Angiotensin II and / or AT₁ receptor inhibitors upon peripheral nerve injury.

7 Literaturverzeichnis

Ahmed Y, Lin DL, Ferguson C, Esparza N, Damaser MS. (2006) Effect of estrogen on urethral function and nerve regeneration following pudendal nerve crush in the female rat. *J Urol.* 175(5):194819-194852.

Araki T, Milbrandt J. (1996) Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. *Neuron* 17(2):353-361.

Armati PJ, Pollard JD, Gatenby P. (1990) Rat and human Schwann cells in vitro can synthesize and express MHC molecules. *Muscle Nerve.* 13(2):106-116.

Armati PJ, Pollard JD. (1996) Immunology of the Schwann cell. *Baillieres Clin Neurol.* 5(1):47-64.

Asakura K, Rodriguez M. (1998) A unique population of circulating autoantibodies promotes central nervous system remyelination. *Mult Scler.* 4(3):217-221.

Barbarese E, Braun PE, Carson JH. (1977) Identification of prelarge and presmall basic proteins in mouse myelin and their structural relationship to large and small basic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(8):3360-3364.

Be'eri H, Reichert F, Saada A, Rotshenker S. (1998) The cytokine network of wallerian degeneration: IL-10 and GM-CSF. *Eur J Neurosci.* 10(8):2707-2713.

Berger P, Niemann A, Suter U. (2006) Schwann cells and the pathogenesis of inherited motor and sensory neuropathies (Charcot-Marie-Tooth disease). *Glia.* 54(4):243-257.

Bergsteinsdóttir K, Kingston A, Jessen KR. (1992) Rat Schwann cells can be induced to express major histocompatibility complex class II molecules in vivo. *J Neurocytol.* 21(5):382-390.

Beuche W, Friede RL. (1984) The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytol.* 13(5):767-796.

Bhatheja K, Field J. (2006) Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(12):1995-1999.

Bigbee JW, Yoshino JE, DeVries GH. (1987) Morphological and proliferative responses of cultured Schwann cells following rapid phagocytosis of a myelin-enriched fraction. *J Neurocytol.* 16(4):487-496.

Bijlsma WA, Jennekens FG, Schotman P, Gispen WH. (1984) Neurotrophic factors and regeneration in the peripheral nervous system. *Psychoneuroendocrinology.* 9(3):199-215.

Bleuel A, de Gasparo M, Whitebread S, Püttner I, Monard D. (1995) Regulation of protease nexin-1 expression in cultured Schwann cells is mediated by angiotensin II receptors. *J Neurosci.* 15(1 Pt 2):750-761.

- Boggs JM. (2006) Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci.* 63(17):1945-1961.
- Bolin LM, Verity AN, Silver JE, Shooter EM, Abrams JS. (1995) Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. *J Neurochem.* 64(2):850-858.
- Borenstein SH, Graham J, Zhang XL, Chamberlain JW. (2000) CD8+ T cells are necessary for recognition of allelic, but not locus-mismatched or xeno-, HLA class I transplantation antigens. *J Immunol.* 165(5):2341-2353.
- Bourde O, Kiefer R, Toyka KV, Hartung HP. (1996) Quantification of interleukin-6 mRNA in wallerian degeneration by competitive reverse transcription polymerase chain reaction. *J Neuroimmunol.* 69(1-2):135-140.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Brockes JP, Fields KL, Raff MC. (1979) Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res.* 165(1):105-118.
- Brück W, Huitinga I, Dijkstra CD. (1996) Liposome-mediated monocyte depletion during wallerian degeneration defines the role of hematogenous phagocytes in myelin removal. *J Neurosci Res.* 46(4):477-484.
- Brück W. (1997) The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol.* 7(2):741-752.
- Byun JH, Lee JH, Choi YJ, Kim JR, Park BW. (2008) Co-expression of nerve growth factor and p75NGFR in the inferior alveolar nerve after mandibular distraction osteogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 37(5):467-472.
- Campana WM. (2007) Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain Behav Immun.* 21(5):522-527.
- Cao Z, Kelly DJ, Cox A, Casley D, Forbes JM, Martinello P, Dean R, Gilbert RE, Cooper ME. (2000) Angiotensin type 2 receptor is expressed in the adult rat kidney and promotes cellular proliferation and apoptosis. *Kidney Int.* 58(6):2437-2451.
- Chappell MC, Tallant EA, Brosnihan KB, Ferrario CM. (1990) Processing of angiotensin peptides by NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cell line. *Peptides.* 11(2):375-380.
- Chaudhry V, Glass JD, Griffin JW. (1992) Wallerian degeneration in peripheral nerve disease. *Neurol Clin.* 10(3):613-627.
- Cheng L, Khan M, Mudge AW. (1995) Calcitonin gene-related peptide promotes Schwann cell proliferation. *J Cell Biol.* 129(3):789-796.

- Clatworthy AL, Illich PA, Castro GA, Walters ET. (1995) Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett.* 184(1):5-8.
- Conti G, Rostami A, Scarpini E, Baron P, Galimberti D, Bresolin N, Contri M, Palumbo C, De Pol A. (2004) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration of the rat peripheral nervous system. *Exp Neurol.* 187(2):350-358.
- Corfas G, Velardez MO, Ko CP, Ratner N, Peles E. (2004) Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions. *J Neurosci.* 24(42):9250-9260.
- Correale J, Villa A. (2004) The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J Neurol.* 251(11):1304-1316.
- Créange A, Barlovatz-Meimon G, Gherardi RK. (1997) Cytokines and peripheral nerve disorders. *Eur Cytokine Netw.* 8(2):145-151.
- Dandona P, Dhindsa S, Ghanim H, Chaudhuri A. (2007) Angiotensin II and inflammation: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade. *J Hum Hypertens.* 21(1):20-27.
- Daniels D, Yee DK, Fluharty SJ. (2007) Angiotensin II receptor signalling. *Exp Physiol.* 92(3):523-527.
- Dietschy JM, Turley SD. (2004) Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res.* 45(8):1375-1397.
- Du Y, Fischer TZ, Clinton-Luke P, Lercher LD, Dreyfus CF. (2006) Distinct effects of p75 in mediating actions of neurotrophins on basal forebrain oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 31(2):366-375.
- Dudley DT, Summerfelt RM. (1993) Regulated expression of angiotensin II (AT₂) binding sites in R3T3 cells. *Regul Pept.* 44(2):199-206.
- Dukkipati VS, Blair HT, Garrick DJ, Murray A. (2006) 'Ovar-Mhc' - ovine major histocompatibility complex: structure and gene polymorphisms. *Genet Mol Res.* 5(4):581-608.
- Eccleston PA. (1992) Regulation of Schwann cell proliferation: mechanisms involved in peripheral nerve development. *Exp Cell Res.* 199(1):1-9.
- Elton TS, Martin MM. (2007) Angiotensin II type 1 receptor gene regulation: transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Hypertension.* 49(5):953-961.
- 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.

- Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J, Ruiz-Ortega M. (2004) Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol.* 15(6):1514-1529.
- Esteban V, Ruperez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Lorenzo O, Demaegdt H, Vanderheyden P, Egido J, Ruiz-Ortega M. (2005) Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor-kappaB and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 96(9):965-973.
- Evans GR. (2000) Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol.* 19(3):312-318.
- Fansa H, Keilhoff G. (2003) Factors influencing nerve regeneration. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 35(2):72-82.
- Fawcett JW, Keynes RJ. (1990) Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 13:43-60.
- Feng YH, Noda K, Saad Y, Liu XP, Husain A, Karnik SS. (1995) The docking of Arg2 of angiotensin II with Asp281 of AT1 receptor is essential for full agonism. *J Biol Chem.* 270(21):12846-12850.
- Fernandez-Valle C, Bunge RP, Bunge MB. (1995) Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from in vitro studies of Wallerian degeneration. *J Neurocytol.* 24(9):667-679.
- Ferrario CM. (2006) Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 7(1):3-14.
- Fu SY, Gordon T. (1997) *Mol Neurobiol.* The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. 4(1-2):67-116.
- Galindo M, Santiago B, Palao G, Gutierrez-Cañas I, Ramirez JC, Pablos JL. (2005) Coexpression of AT1 and AT2 receptors by human fibroblasts is associated with resistance to angiotensin II. *Peptides.* 26(9):1647-1653.
- Gallinat S, Csikos T, Meffert S, Herdegen T, Stoll M, Unger T. (1997) The angiotensin AT2 receptor down-regulates neurofilament M in PC12W cells. *Neurosci Lett.* 227(1):29-32.
- Gallinat, S., Yu, M., Dorst, A., Unger, T., and 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.
- Gao L, Wang W, Wang W, Li H, Sumners C, Zucker IH. (2008) Effects of angiotensin type 2 receptor overexpression in the rostral ventrolateral medulla on blood pressure and urine excretion in normal rats. *Hypertension.* 51(2):521-527.
- George A, Buehl A, Sommer C. (2004) Wallerian degeneration after crush injury of rat sciatic nerve increases endo- and epineurial tumor necrosis factor-alpha protein. *Neurosci Lett.* 372(3):215-219.

- George EB, Glass JD, Griffin JW. (1995) Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J Neurosci.* 15(10):6445-6452.
- Gold R, Archelos JJ, Hartung HP. (1999) Mechanisms of immune regulation in the peripheral nervous system. *Brain Pathol.* 9(2):343-360.
- Gold R, Toyka KV, Hartung HP. (1995) Synergistic effect of IFN-gamma and TNF-alpha on expression of immune molecules and antigen presentation by Schwann cells. *Cell Immunol.* 165(1):65-70.
- Gold R, Zielasek J, Kiefer R, Toyka KV, Hartung HP. (1996) Secretion of nitrite by Schwann cells and its effect on T-cell activation in vitro. *Cell Immunol.* 25;168(1):69-77.
- Gosselin D, Rivest S. (2007) Role of IL-1 and TNF in the brain: twenty years of progress on a Dr. Jekyll/Mr. Hyde duality of the innate immune system. *Brain Behav Immun.* 21(3):281-289.
- Gould RM. (1990) Metabolic organization of the myelinating Schwann cell. *Ann N Y Acad Sci.* 605:44-54.
- Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE. (1991) Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest.* 88(3):921-933.
- Greenfield S, Brostoff S, Eylar EH, Morell P. (1973) Protein composition of myelin of the peripheral nervous system. *J Neurochem.* 20(4):1207-1216.
- Greenfield S, Weise MJ, Gantt G, Hogan EL, Brostoff SW. (1982) Basic proteins of rodent peripheral nerve myelin: immunochemical identification of the 21.5K, 18.5K, 17K, 14K, and P2 proteins. *J Neurochem.* 39(5):1278-1282.
- Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. (2000) Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(10):2175-2183.
- Haastert K, Mauritz C, Chaturvedi S, Grothe C. (2007) Human and rat adult Schwann cell cultures: fast and efficient enrichment and highly effective non-viral transfection protocol. *Nat Protoc.* 2(1):99-104.
- Hall S. (1997) Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat.* 190 (Pt 1):57-71.
- Hallberg M, Nyberg F. (2003) Neuropeptide conversion to bioactive fragments--an important pathway in neuromodulation. *Curr Protein Pept Sci.* 4(1):31-44.
- Harauz G, Ishiyama N, Hill CM, Bates IR, Libich DS, Farès C. (2004) Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis. *Micron.* 35(7):503-542.
- Hattori A, Iwasaki S, Murase K, Tsujimoto M, Sato M, Hayashi K, Kohno M. (1994) Tumor necrosis factor is markedly synergistic with interleukin 1 and interferon-

gamma in stimulating the production of nerve growth factor in fibroblasts. *FEBS Lett.* 340(3):177-180.

Hattori Y, Hattori S, Akimoto K, Nishikimi T, Suzuki K, Matsuoka H, Kasai K. (2007) Globular adiponectin activates nuclear factor-kappaB and activating protein-1 and enhances angiotensin II-induced proliferation in cardiac fibroblasts. *Diabetes.* 56(3):804-808.

Hayasaka K, Himoro M, Wang Y, Takata M, Minoshima S, Shimizu N, Miura M, Uyemura K, Takada G. (1993) Structure and chromosomal localization of the gene encoding the human myelin protein zero (MPZ). *Genomics.* 17(3):755-758.

Heerding JN, Yee DK, Jacobs SL, Fluharty SJ. (1997) Mutational analysis of the angiotensin II type 2 receptor: contribution of conserved extracellular amino acids. *Regul Pept.* 72(2-3):97-103.

Heumann R. (1987) Regulation of the synthesis of nerve growth factor. *J Exp Biol.* 132:133-150.

Hiroji Uemura, Hitoshi Ishiguro, Yukari Ishiguro, Kouji Hoshino, Satoru Takahashi and Yoshinobu Kubota. (2008) DNA Damage and Cellular Stress Responses. Angiotensin II Induces Oxidative Stress in Prostate Cancer. *Molecular Cancer Research* 6, February 1: 250-258.

Hjorth SA, Schambye HT, Greenlee WJ, Schwartz TW. (1994) Identification of peptide binding residues in the extracellular domains of the AT1 receptor. *J Biol Chem.* 269(49):30953-30959.

Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. (2006) Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene.* 25(51):6706-6716.

Hu J, Zou S, Tang Z, Wang D, Li J, Gao Z. (2003) Response of Schwann cells in the inferior alveolar nerve to distraction osteogenesis: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 32(3):318-324.

Huang XC, Shenoy UV, Richards EM, Sumners C. (1997) Modulation of angiotensin II type 2 receptor mRNA in rat hypothalamus and brainstem neuronal cultures by growth factors. *Brain Res Mol Brain Res.* 47:229-236.

Hunyady L, Balla T, Catt KJ. (1996) The ligand binding site of the angiotensin AT1 receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 17(4):135-140.

Inouye H, Kirschner DA. (1988) Membrane interactions in nerve myelin: II. Determination of surface charge from biochemical data. *Biophys J.* 53(2):247-260.

Jander S, Lausberg F, Stoll G. (2001) Differential recruitment of CD8+ macrophages during Wallerian degeneration in the peripheral and central nervous system. *Brain Pathol.* 11(1):27-38.

Jander S, Pohl J, Gillen C, Stoll G. (1996) Differential expression of interleukin-10 mRNA in Wallerian degeneration and immune-mediated inflammation of the rat peripheral nervous system. *J Neurosci Res.* 15;43(2):254-259.

- Jessen KR, Brennan A, Morgan L, Mirsky R, Kent A, Hashimoto Y, Gavrilovic J. (1994) The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron*. 12(3):509-527.
- Jessen KR, Mirsky R. (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*. 6(9):671-682.
- Jessen KR, Mirsky R. (1992) Schwann cells: early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation. *Curr Opin Neurobiol*. 2(5):575-581.
- Jung KH, Chu K, Lee ST, Kim SJ, Song EC, Kim EH, Park DK, Sinn DI, Kim JM, Kim M, Roh JK. (2007) Blockade of AT1 receptor reduces apoptosis, inflammation, and oxidative stress in normotensive rats with intracerebral hemorrhage. *J Pharmacol Exp Ther*. 322(3):1051-1058.
- Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. (2005) Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta*. 1745(3):287-299.
- Karin M, Ben-Neriah Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*. 18:621-663.
- Kieseier BC, Hartung HP, Wiendl H. (2006) Immune circuitry in the peripheral nervous system. *Curr Opin Neurol*. 19(5):437-445.
- Kim KA, Park CY, Lim Y, Lee KH. (2000) Recent advances in particulate-induced pulmonary fibrosis; for the application of possible strategy experimentally and clinically. *Curr Drug Targets*. 1(3):297-307.
- Kingston AE, Bergsteinsdottir K, Jessen KR, Van der Meide PH, Colston MJ, Mirsky R. (1989) Schwann cells co-cultured with stimulated T cells and antigen express major histocompatibility complex (MHC) class II determinants without interferon-gamma pretreatment: synergistic effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor on MHC class II induction. *Eur J Immunol*. 19(1):177-183.
- LaBonne C, Bronner-Fraser M. (1999) Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 15:81-112.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-685.
- Laflamme L, Gasparo M, Gallo JM, Payet MD, Gallo-Payet N. (1996) Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT2 receptors in NG108-15 cells. Effect counteracted by the AT1 receptors. *J Biol Chem*. 271(37):22729-22735.
- Lai C. (2005) Peripheral glia: Schwann cells in motion. *Curr Biol*. 15(9):R332-334.
- Laurà M, Mazzeo A, Aguenouz M, Santoro M, Catania MA, Migliorato A, Calapai G, Vita G. (2006) Immunolocalization and activation of nuclear factor-kappaB in the sciatic nerves of rats with experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol*. 174(1-2):32-38.
- Lemke G, Lamar E, Patterson J. (1988) Isolation and analysis of the gene encoding peripheral myelin protein zero. *Neuron*. 1(1):73-83.

- Levy D, Zochodne DW. (2004) NO pain: potential roles of nitric oxide in neuropathic pain. *Pain Pract.* 4(1):11-18.
- Liefner M, Siebert H, Sachse T, Michel U, Kollias G, Brueck W. (2000) The role of TNF-alpha during Wallerian degeneration. *J Neuroimm* 108: 147-152.
- Li JY, Avallet O, Berthelon MC, Langlois D, Saez JM. (1999) Transcriptional and translational regulation of angiotensin II type 2 receptor by angiotensin II and growth factors. *Endocrinology.* (11):4988-4994.
- Liem KF Jr, Tremml G, Roelink H, Jessell TM. (1995) Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell.* 82(6):969-979.
- Lisak RP, Skundric D, Bealmear B, Ragheb S. (1997) The role of cytokines in Schwann cell damage, protection, and repair. *J Infect Dis.* 176 Suppl 2:173-179.
- Lobsiger CS, Schweitzer B, Taylor V, Suter U. (2000) Platelet-derived growth factor-BB supports the survival of cultured rat Schwann cell precursors in synergy with neurotrophin-3. *Glia.* 30(3):290-300.
- Lobsiger CS, Smith PM, Buchstaller J, Schweitzer B, Franklin RJ, Suter U, Taylor V. (2001) SpL201: a conditionally immortalized Schwann cell precursor line that generates myelin. *Glia.* 36(1):31-47.
- Lobsiger CS, Taylor V, Suter U. (2002) The early life of a Schwann cell. *Biol Chem.* 383(2):245-253.
- Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P, Herdegen T, Sievers J, Unger T. (1998) The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med.* 188(4):661-670.
- Lüllmann-Rauch R. (2006) Taschenlehrbuch Histologie. S. 180-190 Thieme Verlag, 2. Auflage
- Małek R, Borowicz KK, Jargiełło M, Czuczwar SJ. (2007) Role of nuclear factor kappaB in the central nervous system. *Pharmacol Rep.* 59(1):25-33.
- Martini R, Schachner M. (1997) Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia.* 19(4):298-310.
- Mattson MP, Meffert MK. (2006) Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ.* 13(5):852-860.
- Mattson MP. (2003) Insulating axons via NF-kappaB. *Nat Neurosci.* 6(2):105-106.
- Mattson MP. (2005) NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons. *Neurochem Res.* 30(6-7):883-893.
- Mäurer M, Toyka KV, Gold R. (2002) Immune mechanisms in acquired demyelinating neuropathies: lessons from animal models. *Neuromuscul Disord.* 212(4):405-414.

- Mauritz C, Grothe C, Haastert K. (2004) Comparative study of cell culture and purification methods to obtain highly enriched cultures of proliferating adult rat Schwann cells. *J Neurosci Res.* 77(3):453-461.
- McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE. (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron.* 13(4):805-811.
- Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger T. (1996) The angiotensin II AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol Cell Endocrinol.* 122(1):59-67.
- Meiri KF, Willard M, Johnson MI. (1988) Distribution and phosphorylation of the growth-associated protein GAP-43 in regenerating sympathetic neurons in culture. *J Neurosci.* 8(7):2571-2581.
- Melendez-Vasquez CV, Einheber S, Salzer JL. (2004) Rho kinase regulates schwann cell myelination and formation of associated axonal domains. *J Neurosci.* 24(16):3953-3963.
- Mémet S. (2006) NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem Pharmacol.* 72(9):1180-1195.
- Meng TC, Fukada T, Tonks NK. (2002) Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell.* 9(2):387-399.
- Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, 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(1):45-54.
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA. (2004) Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science.* 304(5671):700-703.
- Montani JP, van Vliet BN. (2004) General physiology and pathophysiology of renin-angiotensin system. S. 3-31. aus *Angiotensin Vol. I*, Editors Unger T und Schölkens BA. Springer Verlag, 1 Auflage.
- Mueller M, Leonhard C, Wacker K, Ringelstein EB, Okabe M, Hickey WF, Kiefer R. (2003) Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. *Lab Invest.* 83(2):175-185.
- Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, Crocker PR, Filbin MT. (1994) A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron.* 13(3):757-767.
- Nicholls J G, Martin A R, Wallace B G. (2002) Vom Neuron zum Gehirn. S. 95-117.
- Nickols JC, Valentine W, Kanwal S, Carter BD. (2003) Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation. *Nat Neurosci.* 6(2):161-167.

- Obermüller N, Unger T, Culman J, Gohlke P, de Gasparo M, Bottari SP. (1991) Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat brain nuclei. *Neurosci Lett.* 132(1):11-15.
- Ohuchi N, Hayashi K, Koike K, Kizawa Y, Kusama T, Ohsawa M, Taniguchi Y, Iwamoto K, Sano M, Murakami H. (2004) Pharmacological properties of angiotensin II receptors in cultured rabbit gingival fibroblasts. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 137(3):281-289.
- Ogata T, Yamamoto S, Nakamura K, Tanaka S. (2006) Signaling axis in schwann cell proliferation and differentiation. *Mol Neurobiol.* 33(1):51-62.
- Oldfors A. (1980) Macrophages in peripheral nerves. An ultrastructural and enzyme histochemical study on rats. *Acta Neuropathol* 49(1):43-49.
- Oro C, Qian H, Thomas WG. (2007) Type 1 angiotensin receptor pharmacology: signaling beyond G proteins. *Pharmacol Ther.* 113(1):210-226.
- Page IH (1987). *Hypertension Mechanisms.* Grune & Stratton, New York, p. 1102.
- Päiväläinen S, Nissinen M, Honkanen H, Lahti O, Kangas SM, Peltonen J, Peltonen S, Heape AM. (2008) Myelination in mouse dorsal root ganglion/Schwann cell cocultures. *Mol Cell Neurosci.* 37(3):568-578.
- Pereira RM, Calegari-Silva TC, Hernandez MO, Saliba AM, Redner P, Pessolani MC, Sarno EN, Sampaio EP, Lopes UG. (2005) Mycobacterium leprae induces NF-kappaB-dependent transcription repression in human Schwann cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 335(1):20-26.
- Perkins ND, Gilmore TD. (2006) Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ.* 13(5):759-772.
- Perry VH, Brown MC. (1992) Role of macrophages in peripheral nerve degeneration and repair. *Bioessays.* 14(6):401-406.
- Pertusa M, Morenilla-Palao C, Carteron C, Viana F, Cabedo H. (2007) Transcriptional control of cholesterol biosynthesis in Schwann cells by axonal neuregulin 1. *J Biol Chem.* 282 (39): 28768-28778.
- Porter S, Clark MB, Glaser L, Bunge RP. (1986) Schwann cells stimulated to proliferate in the absence of neurons retain full functional capability. *J Neurosci.* 6(10):3070-3078
- Reichert F, Levitzky R, Rotshenker S. (1996) Interleukin 6 in intact and injured mouse peripheral nerves. *Eur J Neurosci.* 8(3):530-535.
- Reinecke K, Lucius R, Reinecke A, Rickert U, Herdegen T, Unger T. (2003) Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT2 receptor and the transcription factor NF-kappaB. *FASEB J.* 17(14):2094-2096.
- Reinecke K. (2004) Die Angiotensin II AT2-Rezeptor vermittelte funktionelle und morphologische Regeneration peripherer Nerven am Modell der experimentellen

- Läsion des Nervus ischiadicus der Ratte. Dissertation an der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Ressot C, Bruzzone R. (2000) Connexin channels in Schwann cells and the development of the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Res Rev.* 32(1):192-202.
- Rochon D, Rousse I, Robitaille R. (2001) Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurosci.* 21(11):3819-3829.
- Roméro-Graillet C, Aberdam E, Clément M, Ortonne JP, Ballotti R. (1997) Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest.* 99(4):635-642.
- Roskamp E, Kaufmann W. (1971) Radioimmunologic determination of angiotensin 2. Study on healthy individuals and on patients with congestive heart failure. *Klin Wochenschr.* 49(15):876-879.
- Rotshenker S, Amar S, Barak V. (1992) Interleukin-1 activity in lesioned peripheral nerve. *J Neuroimmunol.* 39(1-2):75-80.
- Saada A, Reichert F, Rotshenker S. (1996) Granulocyte macrophage colony stimulating factor produced in lesioned peripheral nerves induces the up-regulation of cell surface expression of MAC-2 by macrophages and Schwann cells. *J Cell Biol.* 133(1):159-167.
- Saavedra JM. (2005) Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol.* 25(3-4):485-512.
- Saito M, Shinohara Y, Sasaki H, Netsu Y, Yoshida M, Nakahata N.J. (2008) Type 1 angiotensin receptor (AT1-R)-mediated decrease in type 2 angiotensin receptor mRNA level is dependent on Gq and extracellular signal-regulated kinase 1//2 in AT1-R-transfected PC12 cells. *J Neuroendocrinol.* 20(3):299-308.
- Samuel NM, MirskyR, Grange JM, Jessen KR. (1987) Expression of major histocompatibility complex class I and class II antigens in human Schwann cell cultures and effects of infection with Mycobacterium leprae. *Clin Exp Immunol.* 68(3):500-509.
- Schicho R, Schuligoi R, Sirinathsinghji DJ, Donnerer J. (1999) Increased expression of GAP-43 in small sensory neurons after stimulation by NGF indicative of neuroregeneration in capsaicin-treated rats. *Regul Pept.* 83(2-3):87-95.
- Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BM. (2007) Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet.* 369(9568):1208-1219.
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U. (2006) PROMETHEUS Lernatlas der Anatomie. Kopf und Neuroanatomie. S.174-180 Thieme Verlag, 1. Auflage.
- Sela-Donenfeld D, Kalcheim C. (1999) Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development.* 126(21):4749-4762.

- Sela-Donenfeld D, Kalcheim C. (2000) Inhibition of noggin expression in the dorsal neural tube by somitogenesis: a mechanism for coordinating the timing of neural crest emigration. *Development*. 127(22):4845-4854.
- Shah NM, Marchionni MA, Isaacs I, Stroobant P, Anderson DJ. (1994) Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. *Cell*. 77(3):349-360.
- Shamash S, Reichert F, Rotshenker S. (2002) The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci*. 22(8):3052-3060.
- Shao J, Nangaku M, Inagi R, Kato H, Miyata T, Matsusaka T, Noiri E, Fujita T. (2007) Receptor-independent intracellular radical scavenging activity of an angiotensin II receptor blocker. *J Hypertens*. 25(8):1643-1649.
- Sherman DL, Brophy PJ. (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci*. 6(9):683-690.
- Shy ME, Garbern JY, Kamholz J. (2002) Hereditary motor and sensory neuropathies: a biological perspective. *Lancet Neurol*. 1(2):110-118.
- Shy ME. (2006) Peripheral neuropathies caused by mutations in the myelin protein zero. *J Neurol Sci*. 242(1-2):55-66.
- Snipes GJ, Suter UJ. (1995) Molecular anatomy and genetics of myelin proteins in the peripheral nervous system. *Anat*. 186 (Pt 3):483-494.
- Son YJ, Thompson WJ. (1995) Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron*. 14(1):133-141.
- Sorescu D, Griendling KK. (2002) Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. *Congest Heart Fail*. 8(3):132-140.
- Steckelings UM, Obermüller N, Bottari SP, Qadri F, Veltmar A, Unger T. (1992) Brain angiotensin: receptors, actions and possible role in hypertension. *Pharmacol Toxicol*. 70(6 Pt 2): 23-27.
- Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD. (1989) Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol*. 18(5):671-683
- Stoll G, Jung S, Jander S, van der Meide P, Hartung HP. (1993) Tumor necrosis factor-alpha in immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration of the rat peripheral nervous system. *J Neuroimmunol*. 45(1-2):175-182.
- Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger. (1995) The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest*. 95(2):651-657.
- Stroth U, Meffert S, Gallinat S, Unger T. (1998) Angiotensin II and NGF differentially influence microtubule proteins in PC12W cells: role of the AT2 receptor. *Brain Res Mol Brain Res*. 53(1-2):187-195.

- Sun Z, Andersson R. (2002) NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock*. 18(2):99-106
- Sun YX, Zhang HY, Wei YM, Zhu F, Wang M, Liao YH. (2008) The mechanism of signal transduction during vascular smooth muscle cell proliferation induced by autoantibodies against angiotensin AT1 receptor from hypertension. *Chin Med J (Engl)*. 121(1):43-48.
- Tan W, Rouen S, Barkus KM, Dremina YS, Hui D, Christianson JA, Wright DE, Yoon SO, Dobrowsky RT. (2003) Nerve growth factor blocks the glucose-induced down-regulation of caveolin-1 expression in Schwann cells via p75 neurotrophin receptor signaling. *J Biol Chem*. 278(25):23151-23162.
- Toth C, Brussee V, Martinez JA, McDonald D, Cunningham FA, Zochodne DW. (2006) Rescue and regeneration of injured peripheral nerve axons by intrathecal insulin. *Neuroscience*. 139(2):429-449.
- Trachtenberg JT, Thompson WJ. (1996) Schwann cell apoptosis at developing neuromuscular junctions is regulated by glial growth factor. *Nature*. 379(6561):174-177.
- Tsai CP, Pollard JD, Armati PJ. (1991) Interferon-gamma inhibition suppresses experimental allergic neuritis: modulation of major histocompatibility complex expression of Schwann cells in vitro. *J Neuroimmunol*. 31(2):133-145.
- Tuccinardi T, Martinelli A. (2007) Computational approaches on angiotensin receptors and their ligands: recent developments and results. *Curr Med Chem*. 14(29):3105-3121.
- Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Höhle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ. (1996) Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl*. 14(5): 95-103.
- Unger T. (2002) The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 89(2A):3A-9A; discussion 10A.
- Van der Zee CE, Nielander HB, Vos JP, Lopes da Silva S, Verhaagen J, Oestreicher AB, Schrama LH, Schotman P, Gispen WH. (1989) Expression of growth-associated protein B-50 (GAP43) in dorsal root ganglia and sciatic nerve during regenerative sprouting. *J Neurosci*. 9(10):3505-3512.
- Vargas ME, Barres BA. (2007) Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci*. 30:153-179.
- von Bohlen und Halbach O, Albrecht D. (2006) The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res*. 326(2):599-616.
- Vroemen M, Weidner N. (2003) Purification of Schwann cells by selection of p75 low affinity nerve growth factor receptor expressing cells from adult peripheral nerve. *J Neurosci Methods*. 5;124(2):135-143.

- Wagner R, Heckman HM, Myers RR. (1998) Wallerian degeneration and hyperalgesia after peripheral nerve injury are glutathione-dependent. *Pain*. 77(2):173-179.
- Wagner R, Myers RR. (1996a) Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. *Neuroscience*. 73(3):625-629.
- Wagner R, Myers RR. (1996b) Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors. *Neuroreport*. 7(18):2897-2901.
- Wahn V, Roesler J, Seger R. Störungen der Granulozyten(Phagozyten)-Funktion. (2004) *Allergologie*, Jahrgang 27, Nr. 3/2004, S. 115–124.
- Wang R, Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE. (1996) Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms. *J Invest Dermatol*. 106(3):419-427.
- Wekerle H, Schwab M, Linington C, Meyermann R. (1986) Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. *Eur J Immunol*. 16(12):1551-1557.
- Wewetzer K, Archelos JJ, Hartung HP, Seilheimer B, Christ B. (1999) The monoclonal antibody 23E9 defines a novel developmentally-regulated Schwann cell surface antigen. *Int J Dev Neurosci*. 17(7):715-725.
- Widdop RE, Vinh A, Henrion D, Jones ES. (2008) Vascular angiotensin AT2 receptors in hypertension and ageing. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 35(4):386-390.
- Widera D, Mikenberg I, Elvers M, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B. (2006a) Tumor necrosis factor alpha triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF-kappaB signaling. *BMC Neurosci*. 7:64.
- Widera D, Mikenberg I, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. (2006b) Potential role of NF-kappaB in adult neural stem cells: the underrated steersman? *Int J Dev Neurosci*. 24(2-3):91-102.
- Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RA, Thaiss F. (2002) Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int*. 61(6):1986-1995.
- Yao EH, Yu Y, Fukuda N. (2006) Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases. *Curr Pharm Biotechnol*. 7(2):101-108.
- Yoon C, Korade Z, Carter BD. (2008) Protein kinase A-induced phosphorylation of the p65 subunit of nuclear factor-kappaB promotes Schwann cell differentiation into a myelinating phenotype. *J Neurosci*. 28(14):3738-3746.
- Yung LM, Leung FP, Yao X, Chen ZY, Huang Y. (2006) Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 6(1):1-19.
- Zhang H, Sun GY. (2006) Expression and regulation of AT1 receptor in rat lung microvascular endothelial cell. *J Surg Res*. 134(2):190-197.

Zhang JH, Huang YG. (2006) The immune system: a new look at pain. *Chin Med J (Engl)*. 119(11):930-938.

Zhou Y, Chen Y, Dirksen WP, Morris M, Periasamy M. (2003) AT1b receptor predominantly mediates contractions in major mouse blood vessels. *Circ Res*. 28;93(11):1089-1094.

Zoidl G, Blass-Kampmann S, D'Urso D, Schmalenbach C, Müller HW. (1995) Retroviral-mediated gene transfer of the peripheral myelin protein PMP22 in Schwann cells: modulation of cell growth. *EMBO J*. 14(6):1122-1128.

Zorick TS and Lemke G, (1996). Schwann cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol*. 8:(6):870-876.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Lucius für die Überlassung des interessanten Themas, seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung meiner thematischen Fragestellung und für die vielen kreativen Diskussionen.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Direktorium des Anatomischen Institutes der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Prof. Dr. J. Sievers; Prof. Dr. R. Lucius und Prof. Dr. Dr. M. Schünke, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Möglichkeit, diese Arbeit am Kieler Institut für Anatomie unter Nutzung aller Räumlichkeiten und Geräte anzufertigen.

Mein ganz großer Dank gilt Frau R. Sprang. Mit unermüdlicher Bereitschaft hat sie ihre wertvollen Erfahrungen an mich weitergegeben, mir stets im Laboralltag hilfreich zur Seite gestanden und mich voran gebracht.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei Frau H. Ristau und Frau R. Worm für ihre Unterstützung im Labor sowie bei Frau M. Grell, Frau M. Kölln, Frau S. Piontek und Frau G. Jopp für die gute Zusammenarbeit. Darüber hinaus danke ich allen Angestellten des Anatomischen Institutes für das 'Wohlfühl-Arbeitsklima'. Ein großes Dankeschön geht dabei an Herrn C. Franke für seine kreativen Hilfestellungen bei den schematischen Abbildungen und die netten Gespräche. Bei Herrn O. Frandsen bedanke ich mich für die schnellen und vielfältigen Problembeseitigungen an meinem Computer.

Meiner wissenschaftlichen Mitstreiterin und Freundin Heike Gustke danke ich auf das allerherzlichste für die unzähligen ideenreichen Gespräche und die kritische Durchsicht des Manuskriptes. Ihr unerschöpflicher Optimismus was mir besonders während des Schreibens dieser Arbeit eine unverzichtbare Hilfe.

Meinen Eltern danke ich an dieser Stelle von Herzen dafür, dass sie mich von je her und in jeglicher Hinsicht bei all meinen Vorhaben unterstützten und mir somit vieles, und zu einem gewissen Teil auch diese Arbeit, ermöglichten.

DANKE an meine Familie: an meinen Mann Andreas, der während aller Phasen dieser Arbeit mit Zuversicht, Geduld und vor allem Verständnis fest hinter mir stand.

an meine Kinder Annika, Jessica und Janne Paul dafür, dass es sie gibt, was mich immer wieder dazu motivierte, meinen eingeschlagenen Weg voran zu gehen. Ich widme ihnen diese Arbeit.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Uta Rickert
 Geburtsdatum: 19.07.1969
 Familienstand: verheiratet, 3 Kinder

Schule und Erstausbildung

1976 –1986 POS, Franzburg
 1986 –1988 EOS, Grimmen
 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
 1988 – 1991 Ausbildung zur Funkmechanikerin mit der
 Spezialisierung Rundfunk- und Tonspeichertechnik
 Abschluss: Facharbeiter / Gesellenbrief

Studium

1996 – 2002 Studium der Humanbiologie an der
 Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald
 1998 Diplomvorprüfung
 2001 Diplomprüfung
 2001 – 2002 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für
 Immunologie und Transfusionsmedizin der
 Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel
 Thema: “Charakterisierung alloreaktiver T-Zellen
 mittels MHC-Klasse-I-Dimere”
 2002 Abschluss des Humanbiologiestudiums mit dem
 Diplom

Promotion

2002 – 2008 Anfertigung der Dissertation am Anatomischen
 Institut der CAU zu Kiel
 Thema: “Untersuchungen zum Einfluss von
 Angiotensin II auf Schwann-Zellen”

Berufliche Tätigkeit

2002 - 2008 Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am
 Anatomischen Institut der CAU zu Kiel

Veröffentlichungen

Rickert U, Welke J, Behrens D, Zavazava N. (2006) A divalent human leukocyte antigen-B7 fusion-protein up-regulates CD25 and CD69 in alloreactive CD8+ T cells bypassing CD28 costimulation. *Transplantation*. 81(9):1337-1344.

Reinecke K, Lucius R, Reinecke A, Rickert U, Herdegen T, Unger T. (2003) Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT2 receptor and the transcription factor NF-kappaB. *FASEB J*. 17(14):2094-2096.

Posterbeiträge

Rickert U, Reinecke K, Herdegen T, Unger T, Lucius R. (2003) Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: 20. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, 1. bis 3. Oktober, Würzburg.

Rickert U, Sievers J, Lucius R. (2004) Influence of angiotensin II on Schwann cell functions in vitro. 99. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, 2. bis 5. April, Wien, Österreich.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig von mir verfasst wurde und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel Verwendung fanden.

Diese Arbeit wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den

.....
(Uta Rickert)