

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Greifswald
(Direktor/in Univ.- Prof. Dr. Karl Heinz Endlich)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema:
Verteilung und funktionelle Bedeutung des Angiotensin (1-7)-bindenden Rezeptors Mas im Gehirn der Maus

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Degrees
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2014

vorgelegt von:
Moritz, Freund
geb. am: 20.07.1988
in: Wolgast

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: Prof. Dr. O. von Bohlen und Halbach

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Bader

(3. Gutachter:)

Ort, Raum: Hörsaal des Instituts für Anatomie, Loefflerstr. 23 C in Greifswald

Tag der Disputation: 03.12.2015

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	v
1 Einleitung.....	1
2 Methoden.....	4
2.1 Tiermodell und Untersuchungstiere.....	4
2.2 Immunhistochemie.....	5
2.2.1 Mas-Färbung.....	5
2.2.2 Phosphohistone H3- und Caspase3-Färbung.....	6
2.2.3 Doublecortin-Färbung.....	7
2.2.4 Doppelfärbung.....	7
2.3 Auswertung.....	8
3 Resultate.....	10
3.1 Spezifität der immunhistologischen Färbung.....	10
3.2 Verteilung von Mas-Protein im Gehirn.....	10
3.3 Immunhistochemie pH3, DCX, Caspase3 und Doppelfärbung..	12
4 Diskussion.....	14
5 Quellen- und Literaturverzeichnis.....	19
6 Zusammenfassung.....	25
7 Eidesstaatliche Erklärung.....	26
8 Tabellarischer Lebenslauf.....	27
9 Danksagung.....	29
10 Anhang.....	30

Abkürzungsverzeichnis

α-	anti
ACE	„angiotensin-converting enzyme“
Am	Aminopeptidase
Ang	Angiotensin
AT	Angiotensin II-Rezeptor
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	„bovine serum albumin“
CA	Cornu ammonis
CP P	Carboxypeptidase P
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DCX	Doublecortin
DG	“dentate gyrus”
IG	Immunglobulin
L-NAME	“L-N ^G -Nitroarginine methyl ester”
LTP	“Long term potentiation”
mRNA	„messenger Ribonucleic acid“
NeuN	“Neuronal Nuclei”
NGS	„normal goat serum“
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
PBS	“phosphate-buffered saline”
PC	piriformer Cortex
PFA	Paraformaldehyd
pH3	“phosphohistone H3”
PSA-NCAM	“polysialylated neuronal cell adhesion molecule”
SVZ	Subventrikularzone
RAS	Renin-Angiotensin System

Vorwort

Die vorliegende Dissertation wurde als kumulative Arbeit eingereicht. Grundlage dieser Arbeit sind die folgenden Publikationen:

Freund, M., Walther, T. & von Bohlen und Halbach, O. (2012)
Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1-7) receptor
Mas in the murine forebrain. *Cell Tissue Res*, 348, 29-35.

Freund, M., Walther, T. & von Bohlen und Halbach, O. (2014)
Effects of the angiotensin-(1-7) receptor Mas on cell proliferation and
on the population of doublecortin positive cells within the dentate
gyrus and the piriform cortex *European Neuropsychopharmacology*, 24, 302-8

Freund, M., Walther, Bohlen und Halbach, O.
Distribution of Mas, an angiotensin-(1-7) receptor, in the murine brain
(Posterpräsentation zur Jahrestagung der Deutschen Anatomischen Gesellschaft in
Würzburg, 2011)

1 Einleitung

Neuronale Plastizität beschreibt die Fähigkeit des Gehirns seine strukturelle und funktionelle Organisation den veränderten Umständen und Bedingungen anzupassen. Sie ist damit eine fundamentale Eigenschaft des Gehirns und essentiell für die Vorgänge des Lernens und für die Ausprägung von Gedächtnisleistungen. Diese beiden wichtigen Prozesse der neuronalen Plastizität sind sichtbar durch morphologische Veränderungen an den Dornen („Spines“) der Dendritenbäume sowie dem Vorgang der Neubildung von Nervenzellen (Neurogenese). Hierbei steht vor allem der Hippocampus im Fokus der Forschung. Das Entstehen von Nervenzellen im erwachsenen Gehirn wird als adulte Neurogenese bezeichnet. Diese verläuft in verschiedenen Stadien und umfasst die Phasen: Proliferation, Prädestination, neuronale Reifung, axonales Wachstum/Wegfindung und Synaptogenese (von Bohlen und Halbach 2011).

In dieser Arbeit beschäftige ich mich mit der Wirkung eines Angiotensin (Ang) Rezeptors auf die Neurogenese. Dieser Rezeptor ist der Angiotensin (1-7)-bindende Mas-Rezeptor. Der bekannteste Vertreter der Angiotensine - und in diesem Zusammenhang des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) - ist Angiotensin II (Ang II), welches insbesondere über seine beiden Rezeptoren Angiotensin II-Rezeptor (AT) 1 und AT2 bei der Regulation von Homöostase und Blutdruck in der Peripherie wirkt. In den letzten Jahrzehnten entdeckte man weitere biologisch aktive Angiotensine, welche zum Teil Abbauprodukte des Ang II sind (von Bohlen und Halbach 2005). Das Angiotensin (1-7) entsteht in einem Nebenweg aus dem Ang I und Ang III (Abbildung 1) und wurde im Gehirn erstmals 1988 beschrieben (Jackson et al. 1988).

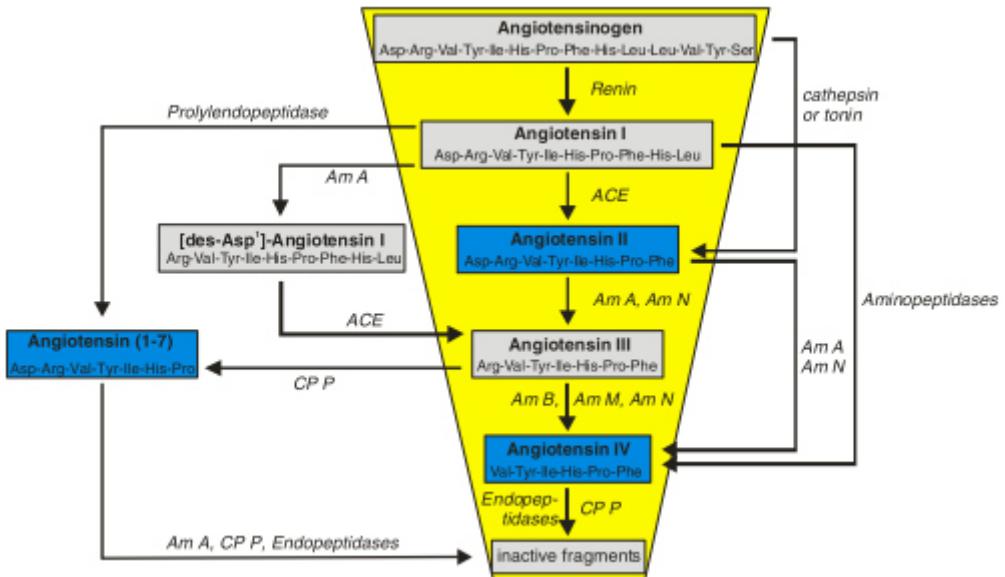


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Biosynthese neuroaktiver Angiotensine aus dem Angiotensinogen

Die Angiotensine, welche neuroaktiv sind, sind blau markiert. Der klassische Signalweg ist gelb markiert und führt zur Produktion von Angiotensin II und Angiotensin IV als bioaktive Endprodukte. Das Angiotensin (1-7) entsteht auf einem Nebenweg aus dem Angiotensin I mit Hilfe der Prolylendopeptidase oder aus dem Angiotensin III durch die Carboxypeptidase P. (ACE angiotensin-converting enzyme, Am aminopeptidase, CP P carboxypeptidase P)

Aus: von Bohlen Und Halbach, O., and Albrecht, D. (2006). The CNS renin-angiotensin system. Cell Tissue Res 326: 599-616. doi: 10.1007/s00441-006-0190-8.

Das Mas-Protoonkogen wurde bereits 1986 erwähnt (Young et al. 1986). Es kodiert für ein G-Protein mit sieben Transmembrandomänen (Brown 1989) und wurde zunächst für einen Rezeptor des Ang II gehalten (Jackson et al. 1988). Allerdings konnten weder Antagonisten gegen den AT1 noch den AT2-Rezeptor die Ang (1-7)-spezifischen Wirkungen blockieren (Santos & Campagnole-Santos 1994), sodass bereits 1994 vermutet wurde, dass Ang (1-7) über eigene Rezeptoren unabhängig von AT1 und AT2 verfügt (Santos et al. 1994). 2003 entdeckte man schließlich den endogenen Mas-Rezeptor, welcher Ang (1-7) spezifisch binden kann (Santos et al. 2003). Mittlerweile ist bekannt, dass Ang (1-7) genauso effizient wie Ang II Vasopressin aus hyperperfundierte Geweben der Hypothalamischen-Neurohypophysären-Achse freisetzen kann (Ferrario et al. 1990) und in Neuronen, cerebralen Endothelien (Kumar et al. 1996) und in der Peripherie vorkommt (Metzger et al. 1995; Alenina et al. 2008). Zudem wurde anhand von in-situ-Hybridisierungen

festgestellt, dass Mas-„messenger ribonucleic acid“ (Mas-mRNA) in verschiedenen Hirnarealen wie dem Hippocampus, dem limbischen System (einschließlich der Amygdala) und Arealen mit kardiovaskulären Funktionen vorkommt (Bunnemann et al. 1990; Martin et al. 1992; Metzger et al. 1995; Becker et al. 2007). Jedoch lassen frühere Versuche vermuten, dass das Mas-Protoonkogen auch eine Rolle im neuronalen Signalweg spielen könnte, vor allem auch im Hinblick darauf, dass es nicht vor dem ersten postnatalen Tag detektiert werden konnte (Martin et al. 1992). Der Gyrus dentatus (DG) des Hippocampus ist neben der Subventrikularzone (SVZ) zur adulten Neurogenese fähig (von Bohlen und Halbach 2011). Ob auch andere Hirnareale zur adulten Neurogenese in der Lage sind, ist nach wie vor in der Diskussion. Eines dieser möglichen Areale ist der piriforme Cortex (PC). Dieser exprimiert z.B. „polysialylated neuronal cell adhesion molecule“ (PSA-NCAM) (Seki & Arai 1991) und Doublecortin (DCX) (Nacher et al. 2001), welche zur Reifung von jungen Neuronen essentiell sind und möglicherweise einen Beitrag zur adulten Neurogenese leisten, da Doublecortin z.B. für die Ausbildung des Axons wichtig ist (Nacher et al. 2001) und PSA-NCAM in Vorgänge der Reorganisation des adulten PC involviert sein könnte (Seki & Arai 1991). Die Neurogenese im PC könnte sogar eine neuroplastische Rolle haben, da die olfaktorische Stimulation zu einer erhöhten Anzahl von DCX-positiven und NeuN-positiven Zellen im PC führt und somit von einer erhöhten Differenzierung bzw. einem verbesserten Überleben neugebildeter Neuronen ausgegangen werden kann (Shapiro et al. 2007). NeuN stellt hierbei einen Marker für reife Neuronen des Gehirns dar, welcher gegen den Zellkern von Neuronen gerichtet ist (Mullen et al. 1992). Auf der Gegenseite führt olfaktorische Bulbektomie (ein Depressions-Tiermodell) zu einem massiven Rückgang von PSA-NCAM- und DCX-positiven Zellen. Jedoch scheint dies keinen Einfluss auf das olfaktorische Gedächtnis zu haben (Gomez-Climent et al. 2011). An dieser Stelle sei auch erwähnt, dass neugebildete Neurone im PC nicht nur in Nagern, sondern auch in adulten Primaten nachgewiesen werden konnte (Bernier et al. 2002).

Da Angiotensin (1-7) nicht nur in der Peripherie exprimiert wird, sondern auch im Gehirn und da Daten existieren, die beschreiben, dass Mas-mRNA im Gehirn exprimiert ist, sollte untersucht werden, ob auch Mas-Protein im Gehirn lokalisiert ist. Diese Untersuchungen sollten am Hirn der Maus unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers durchgeführt werden, welcher gegen die 3. zytoplasmatische Schleife dieses Rezeptors gerichtet ist.

Nachdem wir zeigen konnten, dass der Rezeptor in Hirnarealen exprimiert wird, die mit adulter Neurogenese in Zusammenhang gebracht werden (Freund et al 2012), war es ein weiteres Ziel zu untersuchen, ob dieser Rezeptor Einfluss auf die adulte Neurogenese haben könnte und eventuell auf welches Stadium eben dieser. Dieser Fragestellung sollte unter Verwendung von Mas-defizienten Mäusen und Markern der Proliferation (mithilfe von Phosphohistone H3 [pH3]), Differenzierung (mithilfe von Doublecortin [DCX]) und Apoptose (mithilfe von aktiver Caspase3) neuronaler Zellen nachgegangen werden.

2 Methoden

2.1 Tiermodell und Untersuchungstiere

Für die Untersuchung bezüglich der Rolle von Mas bei der adulten Neurogenese wurden adulte Mas-defiziente Mäuse und deren Kontrollgeschwister (+/+) verwendet, die aus heterozygoten Nachzuchten entstanden. Diese Tiere wurden uns von der Arbeitsgruppe von Thomas Walter bereitgestellt. Diese Arbeitsgruppe hat die Tiere erstmals 1998 publiziert (Walther et al. 1998). Die Mas-Knockout Mäuse wurden durch eine Unterbrechung des Mas-Protoonkogens erzielt. Dies wurde erreicht, indem embryonale Stammzellen mit einem Konstrukt (Abbildung 2A) transfiziert wurden. Die homologe Rekombination führte zur Deletion einer 253 Aminosäuren langen Amino-terminalen Region von Mas (einschließlich der sechs transmembranösen Domänen) in homozygoten Mäusen, die von den Klonen abstammten (Abbildung 2B). Dies führte unter anderem zu einem Verlust der Mas-Expression im Gehirn wie auch im Hoden (Figur 2C).

Die Tötung der Tiere erfolgte mit einer Überdosis Diethylether. Im Anschluss daran eröffneten wir den Thorax, um eine Kanüle zur transkardialen Perfusion in den linken Ventrikel einzubringen. Das rechte Atrium wurde durch einen Schnitt eröffnet. Mit Hilfe einer Rollerpumpe perfundierten wir zuerst für zehn Minuten mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) und danach für weitere fünf Minuten mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA). Im direkten Anschluss an die Perfusion wurden die Tiere dekapitiert. Um das komplette Gehirn aus der Schädelhöhle mittels Spatel zu heben,

durchschnitten wir die Schädelknochen entlang der Schädelnähte über das Foramen magnum. Danach erfolgte die Nachfixierung des Gehirns in 4%igem PFA. Mit einem Vibratome (VT 1000 S; Leica, Germany) wurden koronale 30 µm Schnitte angefertigt und anschließend in 20% Ethanol gesammelt.

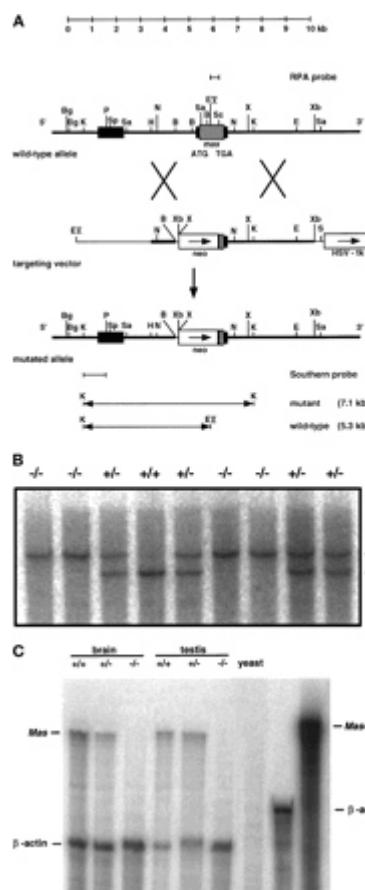


Abbildung 2: Generierung von Mas-Knockout Mäusen

Der Teil des Mas-Gens, welches für die ersten 253 von 324 Aminosäuren inklusive dem ATG-Codon kodiert, ist durch ein Gen mit Neomycin-Resistenz ersetzt worden, welches als transkriptionaler Terminator fungiert. Das Thymidin-Kinase Gen des Herpes-simplex Virus (HSV-tk) wird vom 3' Ende des Konstrukt exprimiert und ermöglicht eine zufällige Integration von Gancyclovir, welches für die Selektion wichtig ist.

Aus: Walther T, Balschun D, Voigt J-P, Fink H, Zuschratter W, Birchmeier C, Ganten D, Bader M (1998)

Sustained long-term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem* 273:11867–11873

2.2 Immunhistochemie

2.2.1 Mas-Färbung

Die Schnitte wurden auf einen Objektträger, der mit Gelatine überzogen war (Superfrost), aufgezogen und anschließend über Nacht bei 37° C im Hybridisierungsofen getrocknet. Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger in Wasser fünf Minuten rehydriert und anschließend zur Antigen-Demaskierung (Puffer: 10 mM Na-Citrat pH 6,0) für 20 Minuten bei 900 W in die Mikrowelle gelegt. Nachdem die Schnitte abgekühlt waren, wurde eine Waschung mit Wasser und

„phosphate-buffered saline“ (PBS) durchgeführt. Hiernach erfolgte die Blockierung mittels 1% „bovine serum albumin“ (BSA) + 0,1% Triton X-100 in PBS. Nach erneutem Waschen der Schnitte folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Kaninchen anti-mas (AAR-013, Alomone Labs, Israel) 1:750 mit 1% BSA + 0,1% Triton X-100 in PBS). Nach Lagerung der Schnitte über Nacht bei 4° C erfolgte am nächsten Tag - nach fünfmaligem Waschen - die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Cy3-konjugiertem Ziege anti-Kaninchen IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Germany) 1:200 mit 1% BSA + 0,1% Triton X-100 in PBS). Als Gegenfärbung wurde anschließend 4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) aufgetragen. Zum Abschluss wurden die Schnitte zum Ausspülen von Salzkristallen mit Wasser gewaschen und am Ende mit Mowiol (Roth, Germany) eingedeckt.

Zur Kontrolle der Wirksamkeit des primären Antikörpers wurden verschiedene Experimente durchgeführt:

- a) Bei der Färbeprozedur wurde der Schritt mit dem primären Antikörper ausgeklammert und die Schnitte lediglich mit dem sekundären Antikörper benetzt, um nachzuweisen, dass der primäre nicht an gehirneigene Strukturen bindet.
- b) Der primäre Antikörper wurde mit einem korrespondierenden Kontrollpeptid kombiniert, welches vom Hersteller (Alomone Labs, Israel) mitgeliefert wurde. Dadurch sollte nachgewiesen werden, dass der primäre Antikörper spezifisch für die ihn vorgesehene Aminosäuresequenz ist.
- c) Testung des Färbeprotokolls an Gewebe von Mas-defizienten Mäusen. Wenn der Antikörper spezifisch für Mas ist, sollte keine Anfärbung erfolgen.

2.2.2 Phosphohistone H3 (pH3) und Caspase3-Färbung

Nachdem die auf Superfrost-Objektträger aufgezogenen Schnitte über Nacht im Hybridisierungsofen bei 37° C getrocknet wurden, erfolgte am nächsten Tag - nach einer Antigen-Demaskierung in der Mikrowelle - die Behandlung mit einer Blockierungslösung (5% NGA + 5% BSA + 0,1% Triton X-100 in PBS). Nach dem Waschen wurde die Lösung mit dem primären Antikörper α-Phosphohistone H3 aus dem Kaninchen (pH3, sc-8656, Santa Cruz Biotechnology Inc., Germany) für die pH3-Färbung und α-Caspase3 (aktive gelöste Form; AB3623, Millipore, Germany) für

die Caspase3-Färbung benetzt. Die Verdünnung bei pH3 betrug 1:100 in 5% BSA + 0,1% Triton X-100 in PBS und bei Caspase3 1:250 in 5% BSA + 0,1% Triton X-100 in PBS. Als Sekundärantikörper wurde Cy3-konjugiertes Ziege anti-Kaninchen IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Germany) in einer Verdünnung von 1:200 (pH3) oder 1:400 (Caspase3) in 5% BSA + 0,1% Triton X-100 in PBS verwendet. Im Anschluss wurden die Schnitte mit DAPI in 1:10000 in destilliertem Wasser für die Darstellung der Zellkerne inkubiert.

2.2.3 Doublecortin (DCX)-Färbung

Die freischwimmenden Schnitte sind in PBS gewaschen und anschließend mit 0,4% Triton X-100 und danach mit 3% BSA + 0,3% Triton X-100 in PBS behandelt worden. Nach erneutem Waschen ist der primäre Antikörper Ziege anti-Doublecortin (DCX), (sc-8066, Santa Cruz Biotechnology Inc., Germany) in einer Verdünnung 1:100 mit 3% BSA + 0,1% Triton X-100 in PBS über Nacht aufgetragen worden. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit biotinyliertem anti-Ziege IgG (Vector Labs, USA) und danach kam der sekundäre Antikörper Cy3-konjugiertes Streptavidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Germany) in 1:2000 in PBS zur Anwendung. Zur Darstellung der Zellkerne wurde zum Schluss DAPI in einer 1:10000 Verdünnung dazugegeben. Ab der Inkubation mit Cy3 sind die Schnitte dunkel gehalten worden und die ganze Zeit über erfolgte die Färbung gekühlt mit Eis.

2.2.4 Doppelfärbung (pH3 und Mas; DCX und Mas)

Doppelfärbung (pH3 und Mas): Die Schnitte wurden auf Superfrost-Objektträger aufgezogen und anschließend über Nacht bei 37° C im Hybridisierungsofen getrocknet. Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger in Wasser fünf Minuten rehydriert und danach zur Antigen-Demaskierung (Puffer: 10 mM Na-Citrat pH 6,0) für 20 Minuten bei 900 W in die Mikrowelle gelegt. Nach dem Waschen wurden die Schnitte blockiert, nochmals gewaschen und als erstes der Antikörper gegen pH3 (1:200 in 3% BSA + 0,1% Triton X-100 in PBS über Nacht bei 4° C) aufgetragen. Danach wurde für die Visualisierung der Schnitte Cy3-konjugiertes anti-Maus IgG

(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Germany) verwendet (1:200). Nach dreimaligem Waschen ist der Mas-Antikörper inkubiert worden (1:750 in 3% BSA und 0,1% Triton X-100 in PBS über Nacht bei 4° C). Hierauf folgte eine Lösung mit Cy2-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Germany) ebenfalls für die Visualisierung. Zum Schluss kam DAPI für die Hintergrundfärbung.

Doppelfärbung (DCX und Mas): Die Schnitte wurden auf Superfrost-Objektträger aufgezogen und anschließend über Nacht bei 37° C im Hybridisierungsofen getrocknet. Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger in Wasser fünf Minuten rehydriert und danach zur Antigen-Demaskierung (Puffer: 10 mM Na-Citrat pH 6,0) für 20 Minuten bei 900 W in eine Mikrowelle verbracht. Nach dem Waschen sind die Schnitte blockiert worden, nochmals gewaschen und als erstes der Antikörper gegen DCX (1:100 in 0,1 Triton X-100 and 3% BSA in PBS; für 3 Tage bei 4° C) benutzt worden. Nach dreimaligem Waschen sind die Schnitte mit einer Lösung inkubiert worden, welche biotinyliertes anti-Ziege IgG (1:200 für zwei Stunden) enthält. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Cy3-konjugiertem Streptavidin (1:2000). Danach wurde der Antikörper gegen Mas (1:750 für 2 Tage bei 4° C) aufgetragen. Anschließend kam zur Visualisierung das Cy2-konjugierte anti-Kaninchen IgG (1:100) dazu und zum Schluss - zur Darstellung der Zellkerne - DAPI.

2.3 Auswertung

Mas-Verteilung: Für die Auswertung wurden mittels Digitalkamera (Axiocam; Zeiss), welche an ein Mikroskop (Axioplan 2; Zeiss) angeschlossen war, Bilder software-unterstützt (Axiovision 4.0; Zeiss, Germany) erstellt. Die Fotos wurden im Anschluss auf der Festplatte gespeichert und „offline“ analysiert. Hierbei wurde das Programm ImageJ (NIH, USA) verwendet, mit dem man die optische Dichte (OD) für jedes Gehirnareal messen kann. Anhand dessen wurde die OD in die Kategorien leicht (+), mittel (++) und stark (+++) eingeteilt. Für eine Determinierung und Objektivierbarkeit der gemessenen OD wurden die folgenden Parameter kontrolliert: Belichtung der Proben mit fluoreszierenden Licht, Belichtungsdauer, die Grenzwerte für die Kategorisierung und die Gammakorrektur. Die Benennung der Gehirnareale erfolgte

anhand der 3. Auflage des „Mouse brain atlas“ nach Franklin und Paxinos (Franklin & Paxinos 2008).

Zellzählung: Die Zellzählung der markierten neugebildeten Zellen (oder Neuronen) wurde für das gesamte Gehirn durchgeführt. Da die Größe der neuronalen Kerne in den Gruppen konstant war, sollte der mögliche systematische Fehler beim Zählen identisch oder ähnlich zu den anderen Gruppen sein (Schober et al. 2007). Folglich wurde die Korrekturformel nach Abercrombies durchgeführt. Diese Methode korrigiert Zählfehler im Bereich des optischen Disectors oder optischen Fraktionators unter Berücksichtigung, dass die gezählten Partikel klein sind, verglichen mit der Schnittdicke (von Bartheld 2002). Außerdem wird der optischen Fraktionator durch die Beschaffenheit des Gewebes beeinflusst und somit sollte bedacht werden, dass sich proliferierende Zellen zu einem ungleichmäßigen und heterogenen Muster gruppieren. Außerdem gibt es eine Wahrscheinlichkeit, dass der Disector die proliferierenden Zellen nicht erfassen könnte (Noori & Fornal 2011). Die Zellzahlen wurden an jedem dritten Gehirnschnitt bestimmt. Um einer Überzählung aufgrund des Vorhandenseins von Färbeartefakten in den Schnitten vorzubeugen, wurden die Zählungen mit der Linderstrom-Lang/Abercrombie (LLA) Gleichung korrigiert (Hedreen 1998):

$$N = n \cdot t(t+H) \text{ oder } N/n = f = t/(t+H)$$

N ist eine Abschätzung der Gesamtzahl in der Region, n ist die gezählte Anzahl von Objekten, t die mittlere Dicke des Schnittes, H die mittlere Höhe der Objekte und f der Umrechnungsfaktor zur Umrechnung von n zu N. In einem ersten Schritt wurde n die gezählte Gesamtzahl gezählt unter Verwendung eines Mikroskops (Axioplan 2 imaging, Zeiss, Deutschland), welches an eine digitale Kamera (AxioCam HRc, Zeiss, Deutschland) gekoppelt war. In einem zweiten Schritt wurde H die Höhe der Zellen in der z-Achse unter Verwendung eines computergesteuerten, motorisierten Tisches, der mit dem Mikroskop verbunden war, sowie die Dicke (t) der Abschnitte mit Hilfe der Software Neurolucida (MBF Bioscience, USA) gemessen. Für das Zählverfahren wurden keine Schutzzonen verwendet, da vor kurzem gezeigt werden konnte, dass die Verwendung von Schutzzonen auch den optischen Disector verzerrn können (Baryshnikova et al. 2006). Die statistische Analyse (ungepaarter t-Test) erfolgte mit dem Prism 5.04 (Graph Pad Inc, USA). Die Daten wurden als Mittelwert \pm SEM ausgedrückt.

3 Resultate

3.1 Spezifität der immunhistologischen Färbung

Das Weglassen des Mas-Antikörpers zeigte keine spezifische Bindung an den Strukturen des Gehirns (Fig. 1a-c in Freund et al. 2012). Dies bestätigte sich sowohl bei der Verwendung des Kontrollpeptides als auch bei der Anwendung des Färbeprotokolls bei Mas-Knockout Mäusen (Fig. 1e-f in Freund et al. 2012). Hiermit ist die Spezifität des Mas-Antikörpers bewiesen worden.

3.2 Verteilung von Mas-Protein im Gehirn

Im Gehirn der Mäuse beschränkte sich die Expression von Mas zum Großteil auf die Neuronen (Fig. 1g-h in Freund et al. 2012); jedoch konnte Mas auch an Blutgefäßen nachgewiesen werden (Fig. 2d in Freund et al. 2012). In den meisten Gehirnarealen wie dem Cortex, limbischen System, Thalamus und dem Hypothalamus konnte Mas detektiert werden. Darüber hinaus fanden sich Mas-positive Neurone auch in den Basalganglien und den zirkumventrikulären Organen (Tabelle 1 in Freund et al. 2012).

Cortex: In den meisten Bereichen des Cortex konnte eine Expression des Mas-Proteins gefunden werden (Fig. 1h in Freund et al. 2012). Hierbei zeigte sich in erster Linie in den Schichten II und III eine starke Ausbildung des Rezeptors. Im primären visuellen, primären auditorischen und motorischen Cortex konnte zusätzlich in der Schicht V eine starke Präsenz nachgewiesen werden. Die größte Dichte des Mas-Rezeptors wurde jedoch im piriformen Cortex detektiert (Tabelle 1; Fig. 2e in Freund et al. 2012).

Hippocampus: Besonders hoch war die Expression im Hippocampus in der Körnerschicht des Gyrus dentatus und der Pyramidenschicht der Regionen Cornu ammonis (CA)1 – CA3 (Tabelle 1 in Freund et al. 2012). Außerdem konnte in leichter Ausprägung auch die Präsenz von Mas in der Molekularschicht des Gyrus dentatus

und dem Stratum radiatum sowie Stratum lacunosum-molekulare von CA1 – CA3 nachgewiesen werden (Fig. 2a-c in Freund et al. 2012). Es handelt sich in diesen Schichten um Interneurone.

Amygdala: Auch in der Amygdala sah man die Expression von Mas; allerdings nicht so ausgeprägt wie im piriformen Cortex oder der Körnerschicht des Gyrus dentatus. Die Amygdala besteht aus mehreren Kernkomplexen. Mas konnte hierbei in der basolateralen Amygdala inklusive dem basolateralen, basomedialen und lateralen Kern (Fig. 2f in Freund et al. 2012) sowie im zentralen und medialen Kernkomplex nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte auch in einigen kortikalen Amygdalakernen, wie z.B. dem vorderen und hinteren kortikalen Kern, die Expression von Mas gezeigt werden. Die höchste Expressionsrate konnte allerdings der Nucleus intercalatus vorweisen (Tabelle 1 in Freund et al. 2012).

Basalganglien: Auch in den Basalganglien kommt Mas vor. Zu den Arealen, die eine Immunreaktivität aufwiesen, gehören das Striatum (Fig. 2g-h in Freund et al. 2012), der Globus pallidus, und der Nucleus subthalamicus der Substantia nigra (Tabelle 1 in Freund et al. 2012).

Thalamus: Im Thalamus konnte in zahlreichen Gebieten nachgewiesen werden, dass Mas nicht exprimiert wird. Allerdings zeigten einige andere Areale eine geringe Expressionsrate, wie der Nucleus laterodorsalis (Tabelle 1 in Freund et al. 2012). Die höchste Rezeptordichte wurde in den Habenula detektiert (Fig. 2i in Freund et al. 2012).

Hypothalamus: Über das gesamte Gebiet des Hypothalamus konnte eine schwache Ausprägung des Rezeptors gezeigt werden. Lediglich der mediale Teil des Nucleus tuberales wies eine mittlere OD vor (Tabelle 1 in Freund et al. 2012).

Zirkumventrikuläre Organe: Die zirkumventrikulären Organe, das Subfornicularorgan und das Subcommissuralorgan befinden sich am Rand des Dritten Ventrikels und besitzen eine inkomplette Blut-Hirn-Schranke. Auch hier befinden sich Mas-positive Zellen (Tabelle 1 in Freund et al. 2012).

3.3 Immunhistochemie pH3, DCX, Caspase3 und Doppelfärbung

Da Mas im Gyrus dentatus nachgewiesen werden konnte und dieser zur adulten Neurogenese fähig ist, untersuchten wir näher, ob Mas auf sich teilenden Zellen und/oder auf Doublecortin-exprimierenden unreifen Neuronen zu finden ist. In Bezug auf Phosphohistone H3 (pH3 als Marker für proliferierende Zellen) konnte die Expression von Mas auf diesen Zellen identifiziert werden (Fig. 1A-C in Freund et al. 2014). Weiterhin zeigten auch Doublecortin-positive junge Neurone eine Mas-Expression (Fig. 1D-J in Freund et al. 2014).

Im nächsten Schritt analysierten wir, ob der Knockout des Mas-Gens einen Effekt auf die adulte Neurogenese des Gyrus dentatus hat.

Im Falle von pH3 zeigte sich, dass der Anstieg pH3-positiver Zellen ($p=0,15$) in den Knockout-Tieren nicht signifikant ist (Wildtyp: 2932 ± 442 ; Knockout: 3954 ± 212) (Fig. 1K-M in Freund et al. 2014). Man sollte an der Stelle jedoch bedenken, dass pH3, genauso wie Bromodesoxyuridin (BrdU) oder Ki-67, kein direkter Marker der Proliferation im Bezug zur Neurogenese ist, da diese Marker lediglich für Stadien der Proliferation spezifisch sind; unabhängig vom Zelltyp (von Bohlen und Halbach 2011). Demzufolge hat der Knockout des Mas-Gens keinen Einfluss auf die generelle Zellproliferation im Gyrus dentatus.

Doublecortin wird von späten mitotischen und frühen postmitotischen Neuronen exprimiert (von Bohlen und Halbach 2011), sodass wir diesen Marker für die Bewertung der adulten Neurogenese benutzten. Der Vergleich zwischen Wildtyp und Knockout erbrachte hierbei einen signifikanten Anstieg Doublecortin-positiver Zellen in den Mas-Knockout Mäusen (Wildtyp: 8669 ± 168 ; Knockout: 17676 ± 1953) (Fig. 1O-Q in Freund et al. 2014). Allerdings ist auch bekannt, dass viele der neugeborenen Neurone im Gyrus dentatus in die Apoptose gehen, da Neurone beim adulten Tier für ihr Überleben in die neuronalen Kreisläufe eingebunden werden müssen (Kim & Sun 2011). Demzufolge ist es möglich, dass parallel zum Anstieg Doublecortin-positiver Neurone auch die Apoptoserate steigt. Um dies näher zu untersuchen, bedienten wir uns einem Marker für die absolute Anzahl Caspase3-positiver Zellen. Es konnte kein signifikanter Anstieg im Gyrus dentatus nachgewiesen werden (Wildtyp: $73,6 \pm 1,34$; Knockout: $56,7 \pm 10,2$; $p = 0,18$) (siehe Abbildung 3).

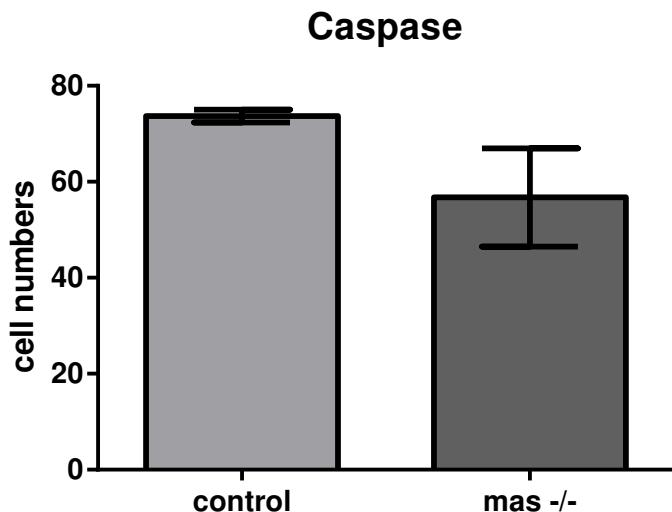


Abbildung 3: Vergleich Caspase3 im Gyrus dentatus

Dargestellt ist der Vergleich zwischen Caspase3-positiven Zellen im Gyrus dentatus in Wildtyp- und Mas-Knockout Mäusen. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Neben dem Gyrus dentatus konnte auch im piriformen Cortex der Maus eine hohe Dichte des Mas-Rezeptors nachgewiesen werden. Da dieser möglicherweise ebenfalls zur adulten Neurogenese fähig ist, untersuchten wir den piriformen Cortex im Detail. Im Wildtyp zeigte sich, dass pH3-positive Zellen auch immunopositiv für Mas sind. Weiterhin zeigte sich auf Blutgefäßen ebenfalls pH3- und Mas-positive Zellen (Fig. 2A-C in Freund et al. 2014). Auch konnten im piriformen Cortex Doublecortin-positive Zellen detektiert werden und genauso wie im Gyrus dentatus sind auch diese Mas-positiv (Fig. 2D-F in Freund et al. 2014). Hierauf basierend untersuchten wir im piriformen Cortex ebenfalls den Effekt vom Mas-Knockout auf die Anzahl pH3-, DCX- und Caspase3-positiver Zellen.

Die Anzahl der proliferierenden Zellen stieg bei den Knockout-Tieren im piriformen Cortex signifikant an (Wildtyp: 2411 ± 145 ; Knockout: 4324 ± 71) (Fig. 2G-I in Freund et al. 2014). Dies korreliert ebenfalls mit der Zahl Doublecortin-positiver Zellen, welche bei Knockout des Mas-Gens signifikant anstiegen (Wildtyp: 1482 ± 24 ; Knockout: 2242 ± 62) (Fig. 2J-L in Freund et al. 2014). Im Bezug auf die Apoptose mit Caspase3 als Marker konnte kein statistischer Unterschied festgestellt werden (Wildtyp: $9,57 \pm 2,65$; Knockout: $9,88 \pm 2,84$; $p = 0,94$) (siehe Abbildung 4).

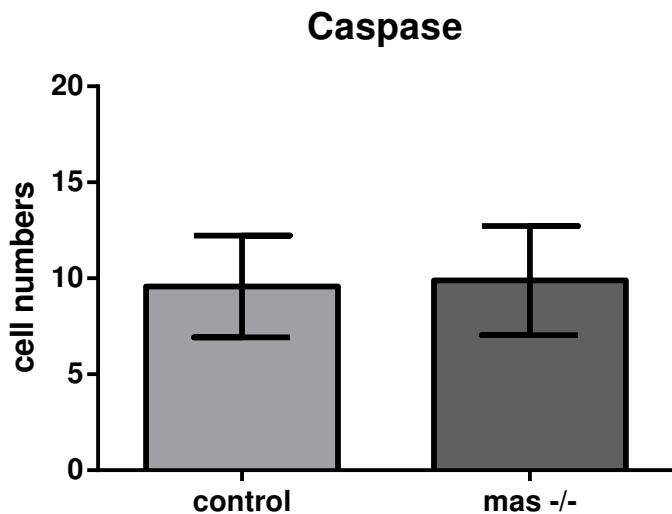


Abbildung 4: Vergleich Caspase3 im piriformen Cortex

Dargestellt ist der Vergleich zwischen Caspase 3-positiven Zellen im piriformen Cortex in Wildtyp- und Mas-Knockout Mäusen. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

4 Diskussion

Mas-Protein ist im Großhirn von Mäusen weitläufig verteilt. Die Expression von Mas war hauptsächlich auf neuronale Zellen begrenzt. Zuvor durchgeführte in-situ Hybridisierungs-Studien hatten ergeben, dass Mas-mRNA in hohem Maße im Hippocampus, einschließlich des Gyrus dentatus und der Bereiche CA1 – CA3, angereichert ist (Bunnemann et al. 1990; Martin et al. 1992). Vergleichbar mit diesen Ergebnissen haben wir festgestellt, dass das Mas-Protein stark im Hippocampus exprimiert wird. Zusätzlich fanden wir immunopositive Zellen in verschiedenen Bereichen der Amygdala. Sowohl der Hippocampus als auch die Amygdala gehören zum limbischen System.

Außerhalb des Hippocampus wurde im piriformen Cortex eine beachtliche Anfärbung für das Mas-Protein gefunden. Es wird spekuliert, dass der piriforme Cortex zur adulten Neurogenese (Pekcec et al. 2006; Rivers et al. 2008) und zur Induktion und Aufrechterhaltung einer LTP (einem elektrophysiologischen Korrelat der synaptischen Plastizität) fähig ist (Jung & Larson 1994). Unter der Voraussetzung, dass funktionelle adulte Neurogenese im piriformen Cortex möglich wäre, könnten

Mechanismen oder Ereignisse, die zu Veränderungen der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus führen, einen Einfluss auf die neuronale Plastizität des piriformen Cortex und somit Wirkung auf Lern- und Gedächtnisleistungen innerhalb dieses Hirnareals haben. Der Verlust von Mas induziert einen massiven Anstieg in der Population der pH3-positiven Zellen, was darauf hinweist, dass Mas einen Einfluss auf die Zellproliferation im Allgemeinen hat, da die Verwendung von pH3 als Marker keine Unterscheidung zwischen neuronalen oder nicht-neuronalen Zellen erlaubt (einschließlich Gliazellen und Blutgefäße). Innerhalb des piriformen Cortex wurden Doublecortin-positive Zellen weniger häufig als im Gyrus dentatus beobachtet. Dennoch konnte eine erhebliche Anzahl an Doublecortin-positiven Zellen detektiert werden. Darüber hinaus wiesen wir nach, dass ein Mangel an Mas eine Zunahme der Doublecortin-positiven Neuronen in diesem Bereich (ohne eine wesentliche Änderung des Zelltods in diesem Bereich) induziert, was für eine Regulation der Doublecortin-positiven neuronalen Population durch den Angiotensin (1-7)-Rezeptor spricht. Allerdings scheint die neuronale Dichte im piriformen Cortex an ausgewachsenen Mas-Knockout Mäusen unverändert zu sein (von Bohlen und Halbach 2001). Jedoch gibt es auch Studien, welche darauf hindeuten, dass der piriforme Cortex nicht zur adulten Neurogenese fähig ist und dementsprechend die Doublecortin-positiven Zellen im piriformen Cortex nicht an der Neurogenese beteiligt sind (Klempin et al. 2011). Diese könnten zu einer Gruppe von ungewöhnlichen, unreifen, nicht neu generierten kortikalen Neuronen gehören, die nicht an der Neurogenese beteiligt sind, welche von der neuronalen Plastizität abhängig sind (Bonfanti & Nacher 2012) und als „Standby“ Neurone agieren könnten (Kempermann 2012).

So konnte die Frage, ob es sich bei den Doublecortin-positiven Zellen um neugebildete Neuronen handelt, welche funktionell in den piriformen Cortex integriert sind oder ob es postmitotische Doublecortin-exprimierende Neuronen sind, nicht durch unseren Ansatz beantwortet werden. Hierzu wären detaillierte stereologische Untersuchungen der verschiedenen neuronalen Populationen innerhalb des piriformen Cortex und die elektrophysiologische Charakterisierung der Population der Doublecortin-positiven Zellen notwendig.

Innerhalb des Hippocampus wurde starke Mas-Immunoreaktivität im Gyrus dentatus nachgewiesen. Der Gyrus dentatus ist bekannt als ein Bereich in dem adulte

Neurogenese stattfindet (von Bohlen und Halbach 2011). Unsere neuen Daten zeigen nun, dass Mas-Knockout Mäuse neben einer verbesserten LTP (Walther et al. 1998), auch eine erhöhte Neurogenese haben. Das Fehlen von Mas hat die Zellproliferation beeinflusst, jedoch war der Anstieg pH3-positiver Zellen nicht statistisch signifikant. Dennoch zeigte der Mangel an Mas im Gyrus dentatus deutliche Veränderungen in der Gruppe von Doublecortin-positiven Zellen, was darauf hinweist, dass Mas eine bestimmte, wichtige Rolle in der späten Phase der adulten Neurogenese hat.

Es wird vermutet, dass die adulte Neurogenese verschiedene Aspekte der Entwicklung von Progenitorzellen im embryonalen Hirn repliziert (Hodge & Hevner 2011). In diesem Zusammenhang sollte jedoch im Auge behalten werden, dass Mas nicht vor der Geburt exprimiert wird (Martin et al. 1992).

Im Jahr 1999 wurde nachgewiesen, dass es eine Verbindung zwischen LTP, Lernen und Neurogenese gibt (van Praag et al. 1999) und zwei Jahre später gelang es den kausalen Zusammenhang zwischen Neurogenese und LTP zu bestätigen (Snyder et al. 2001). Einerseits steigert LTP die Neurogenese im erwachsenen Gyrus dentatus (Bruel-Jungermann et al. 2006) und andererseits beeinflusst die Neurogenese die LTP (Massa et al. 2006).

Innerhalb der Amygdala ist Ang (1-7) zur Steigerung der LTP fähig und es deutet darauf hin, dass dieser Effekt durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt wird, da die Blockade der Stickstoffmonoxid Synthese mit L-NAME in der Folge zu einer Blockade der Ang (1-7)-vermittelten Steigerung der LTP führt (Albrecht 2007).

Jedoch repräsentiert Mas nicht nur einen Rezeptor für Ang (1-7), sondern ist auch in der Lage mit dem AT1-Rezeptor zu hetero-oligomerisieren und damit Wirkungen von Angiotensin II zu blockieren (Kostenis et al. 2005). In diesem Zusammenhang hat sich gezeigt, dass Mäuse, denen das Mas-Protoonkogen fehlt, eine entgegengesetzte Wirkung von Angiotensin II, zumindest in der Amygdala, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen aufweisen. Dies belegt in in-vitro Studien eine funktionelle Interaktion zwischen Mas und dem AT1-Rezeptor (von Bohlen und Halbach 2000). Darüber hinaus ist ebenfalls eine funktionelle Interaktion des Ang (1-7)-Rezeptors Mas mit dem AT1-Rezeptor für das Herz der Maus beschrieben worden, welche zu der Freisetzung von Prostaglandinen und Stickoxid führt (Castro et al. 2005). Allerdings kann Mas nicht nur zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid

durch die Wechselwirkung mit AT1-Rezeptoren führen, sondern ist auch zur direkten Stickstoffmonoxid-Bildung in der Lage (Gwathmey et al. 2010).

Da Stickstoffmonoxid zur Hemmung der Neurogenese (Zhu et al. 2006) und Mas zur Interaktion mit dem Stickstoffmonoxid-System in der Lage ist, könnte Mas sowohl direkt als auch indirekt zur Bildung von Stickstoffmonoxid führen und somit wiederum die Neurogenese hemmen. Diese Annahme wird auch dadurch unterstützt, dass Ang (1-7) das Wachstum von Herzmuskelzellen (Freeman et al. 1996) durch Aktivierung von Mas inhibiert (Tallant et al 2005).

Da Ang (1-7) durch die Aktivierung des Rezeptors Mas das Wachstum von z. B. Herzmuskelzellen (Freeman et al. 1996; Tallant et al. 2005) und vaskulären glatten Muskelzellen (Zhang et al 2010) hemmt und da Mas sich im Gyrus dentatus und piriformen Cortex der Maus befindet (Freund et al. 2012), könnte Ang (1-7) auch über seinen Rezeptor die adulte Neurogenese im Gehirn beeinflussen. Ang (1-7) erhöht die Erregbarkeit im Bereich von CA1-Neuronen des Hippocampus und erhöht die hippocampale LTP im Bereich CA1, während in Mas-Knockout Mäusen keine Ang (1-7) induzierte Erhöhung der hippocampalen LTP gezeigt werden konnte (Hellner et al. 2005). Für die gezielte Deletion des Mas-Protoonkogens ist beschrieben worden, dass die Dauer der LTP im Gyrus dentatus erhöht wird (Walther et al. 1998). Diese Ergebnisse deuten auf eine Rolle von Ang (1-7) und seinem zugehörigen Rezeptor Mas in Mechanismen des Lernens und Gedächtnisses hin. Im Morris Water Maze-Test (Walther et al. 1998) zeigten Mas-Knockout Mäuse ein leichtes, aber nicht signifikant verbessertes räumliches Lernen und darüber hinaus auch Änderungen im Y-Labyrinth-Test (Lazaroni et al. 2012). Allerdings weisen diese Knockout-Mäuse neben einer Beeinträchtigung des Merkens neuartiger Objekte und der räumlichen Objekterkennung (Lazaroni et al. 2012) auch eine verbesserte LTP im Gyrus dentatus auf (Walther et al. 1998). Zusammen mit der Tatsache, dass Mas-Knockout Mäuse eine erhöhte Dauer der LTP im Gyrus dentatus vorweisen (Walther et al. 1998), kann Mas eine entscheidende Rolle im Hippocampus in der neuronalen Plastizität spielen.

Schließlich muss erwähnt werden, dass Mas-Immunoreaktivität in mehreren Blutgefäßen nachgewiesen werden konnte. Die Anwesenheit von Mas in den zerebralen Blutgefäßen wurde erstmals 1996 durch Northern Blot-Analysen

beschrieben und als endotheliale Mikrogefäßzellen identifiziert (Kumar et al. 1996). Somit kann vermutet werden, dass Mas innerhalb des Gehirns eine Rolle bei der Aufrechterhaltung vasorelaxierender Prozesse und in der Vasoprotection spielt (Peiro et al. 2007; Tesanovic et al. 2010) und dass die Hemmung von Angiotensin (1-7) zur Hemmung des vaskulären Wachstums fähig ist (Tallant & Clark 2003). Somit kann der Knockout von Mas proliferative Ereignisse auch innerhalb von Blutgefäßen des Gehirns induzieren.

Zusammengekommen zeigen unsere Ergebnisse, dass das Mas-Protein in einer Vielzahl von Strukturen innerhalb des Gehirns der Maus exprimiert wird, insbesondere in limbischen Systemen (Freund et al 2012).

Weiterhin zeigen unsere Daten, dass der Knockout von Mas nicht nur eine erhöhte LTP induziert, sondern auch morphologische Veränderungen und somit Angiotensin (1-7) über seinen korrespondierenden Rezeptor Mas eine wichtige Rolle für die neuronale Plastizität in diesen Bereichen einnimmt.

5 Quellen- und Literaturverzeichnis

- Albrecht D (2007) Angiotensin-(1–7)-induced plasticity changes in the lateral amygdala are mediated by COX-2 and NO. *Learn Mem.* 14:177–184.
- Alenina N, Xu P, Rentzsch B, Patkin EL, Bader M (2008) Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1–7). *Exp Physiol.* 93:528–537.
- Baryshnikova LM, von Bohlen und Halbach O, Kaplan S, von Bartheld CS (2006) Two distinct events, section compression and loss of particles (“lost caps”), contribute to z-axis distortion and bias in optical disector counting. *Microsc. Res. Tech.* 69:738–756.
- Becker LK, Etelvino GM, Walther T, Santos RA, Campagnole-Santos MJ (2007) Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293:H1416–H1424.
- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A (2002) Newly generated neurons in the amygdale and adjoining cortex of adult primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:11464–11469.
- Block CH, Santos RA, Brosnihan KB, Ferrario CM (1988) Immunocytochemical localization of angiotensin-(1–7) in the rat forebrain. *Peptides.* 9:1395–1401.
- Brown K (1989) Angiotensin receptors are implicated in the mechanism of mas action. *TIPS.* 10:87–89.
- Bonfanti L, Nacher J (2012) New scenarios for neuronal structural plasticity in non-neurogenic brain parenchyma: the case of cortical layer II immature neurons. *Prog. Neurobiol.* 98:1–15.
- Bunnemann B, Fuxe K, Metzger R, Mullins J, Jackson TR, Hanley MR, Ganten D (1990) Autoradiographic localization of masproto-oncogene mRNA in adult rat brain using *in situ* hybridization. *Neurosci Lett.* 114:147–153.
- Bruel-Jungerman E, Davis S, Rampon C, Laroche S (2006) Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J. Neurosci.* 26:5888–5893.
- Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP (2005) Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1–7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension.* 46:937–942.
- Chappell MC, Brosnihan KB, Diz DI, Ferrario CM (1989) Identification of angiotensin-(1–7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *J Biol Chem.* 264:16518–16523.

- Ferrario CM, Barnes KL, Block CH, Brosnihan KB, Diz DI, Khosla MC, Santos RA (1990) Pathways of angiotensin formation and function in the brain. *Hypertension*. 15:I13–I19.
- Franklin KBJ, Paxinos G (2008) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego.
- Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, Tallant EA (1996) Angiotensin-(1–7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension*. 28:104–108.
- Freund M, Walther T, von Bohlen und Halbach O (2012) Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1–7) receptor Mas in the murine forebrain. *Cell Tissue Res.* 348:29–35.
- Freund M, Walther T, von Bohlen und Halbach O (2014) Effects of the angiotensin-(1–7) receptor Mas on cell proliferation and on the population of doublecortin positive cells within the dentate gyrus and the piriform cortex. *Eur Neuropsychopharmacol.* 24:302–8.
- Gomez-Climent MA, Hernandez-Gonzalez S, Shionoya K, Belles, M, Alonso-Llosa G, Datiche F, Nacher J (2011) Olfactory bulbectomy, but not odor conditioned aversion, induces the differentiation of immature neurons in the adult rat piriform cortex. *Neuroscience*. 181:18–27.
- Guo F, Maeda Y, Ma J, Xu J, Horiuchi M, Miers L, Vaccarino F, Pleasure D (2010) Pyramidal neurons are generated from oligodendroglial progenitor cells in adult piriform cortex. *J. Neurosci.* 30:12036–12049.
- Gwathmey TM, Westwood BM, Pirro NT, Tang L, Rose JC, Diz DI, Chappell MC (2010) Nuclear angiotensin-(1–7) receptor is functionally coupled to the formation of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol.* 299:F983–F990.
- Hedreen, JC (1998) Lost caps in histological counting methods. *Anat. Rec.* 250:366–372.
- Hellner K, Walther T, Schubert M, Albrecht D (2005) Angiotensin-(1–7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein coupled receptor Mas. *Mol Cell Neurosci.* 29:427–435.
- Hodge RD, Hevner RF (2011) Expression and actions of transcription factors in adult hippocampal neurogenesis. *Dev. Neurobiol.* 71:680–689.
- Jackson TR, Blair LAC, Marshall J, Goedert M, Hanley MR (1988) The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 335:437–440.
- Jung MW, Larson J (1994) Further characteristics of long-term potentiation in piriform cortex. *Synapse*. 18:298–306.
- Kempermann G (2012) New neurons for ‘survival of the fittest’. *Nat. Rev. Neurosci.* 13:727–736.

- Kim WR, Sun W (2011) Programmed cell death during postnatal development of the rodent nervous system. *Dev. Growth Differ.* 53:225–235.
- Klempin F, Kronenberg G, Cheung G, Kettenmann H, Kempermann G (2011) Properties of doublecortin-(DCX)-expressing cells in the piriform cortex compared to the neurogenic dentate gyrus of adult mice. *PLoS One* 6:e25760.
- Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, Horvat V, Volk B, Kempermann G (2010) Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One* 5:e8809.
- Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP, Walther T (2005) G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*. 111:1806–1813.
- Lazaroni TL, Raslan AC, Fontes WR, de Oliveira ML, Bader M, Alenina N, Moraes MF, Dos Santos RA, Pereira GS (2012) Angiotensin-(1–7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 97:113–123.
- Kumar M, Grammas P, Giacomelli F, Wiener J (1996) Selective expression of c-mas proto-oncogene in rat cerebral endothelial cells. *NeuroReport*. 8:93–96.
- Martin KA, Grant SG, Hockfield S (1992) The mas proto-oncogene is developmentally regulated in the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res.* 68:75–82.
- Massa F, Koehl M, Wiesner T, Grosjean N, Revest JM, Piazza PV, Abrous DN, Oliet SH (2011) Conditional reduction of adult neurogenesis impairs bidirectional hippocampal synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:6644–6649.
- Metzger R, Bader M, Ludwig G, Berberich C, Bunnemann B, Ganten D (1995) Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissue. *FEBS*. 357:27–32.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 116:201–11.
- Nacher J, Crespo C, McEwen BS (2001) Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur. J. Neurosci.* 14:629–644.
- Noori HR, Fornal CA (2011) The appropriateness of unbiased optical fractionators to assess cell proliferation in the adult hippocampus. *Front. Neurosci.* 5:140.
- Pérez C, Vallejo S, Gembardt F, Azcutia V, Heringer-Walther S, Rodriguez-Manas L, Schultheiss HP, Sanchez-Ferrer CF, Walther T (2007) Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function. *J Hypertens.* 25:2421–2425.

- Pekcec A, Loscher W, Potschka H (2006) Neurogenesis in the adult rat piriform cortex. *NeuroReport*. 17:571–574.
- Plumpe T, Ehninger D, Steiner B, Klempin F, Jessberger S, Brandt M, Romer B, Rodriguez GR, Kronenberg G, Kempermann G (2006) Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci*. 7: 77.
- Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, Kessaris N, Richardson WD (2008) PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci*. 11:1392–1401.
- Sampaio WO, Nascimento AA, Santos RA (2003) Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1–7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284:H1985–H1994.
- Santos RA, Campagnole-Santos MJ (1994) Central and peripheral actions of angiotensin-(1–7). *Braz J Med Biol Res*. 27:1033–1047.
- Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Baracho NC, Fontes MA, Silva LC, Neves LA, Oliveira DR, Caligorne SM, Rodrigues AR, Gropen JC (1994) Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1–7): evidence that the actions of angiotensin-(1–7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull*. 35:293–298.
- Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T (2003) Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:8258–8263.
- Sasaki T, Kitagawa K, Yagita Y, Sugiura S, Omura-Matsuoka E, Tanaka S, Matsushita K, Okano H, Tsujimoto Y, Hori M (2006) Bcl2 enhances survival of newborn neurons in the normal and ischemic hippocampus. *J. Neurosci. Res*. 84:1187–1196.
- Schober A, Peterziel H, von Bartheld CS, Simon H, Kriegstein K, Unsicker K (2007) GDN applied to the MPTP-lesioned nigrostriatal system requires TGF-beta for its neuroprotective action. *Neurobiol. Dis*. 25:378–391.
- Seki T, Arai Y (1991) Expression of highly polysialylated NCAM in the neocortex and piriform cortex of the developing and the adult rat. *Anat. Embryol. (Berl.)*. 184: 395–401.
- Shapiro LA, Ng KL, Zhou QY, Ribak CE (2007) Olfactory enrichment enhances the survival of newly born cortical neurons in adult mice. *Neuroreport*. 18:981–985.
- Snyder JS, Kee N, Wojtowicz JM (2001) Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J. Neurophysiol*. 85:2423–2431.

- Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G (2006) Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*. 54:805–814.
- Tallant EA, Clark MA (2003) Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1–7). *Hypertension*. 42:574–579.
- Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE (2005) Angiotensin-(1–7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289:H1560–H1566.
- Tesanovic S, Vinh A, Gaspari TA, Casley D, Widdop RE (2010) Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1–7) in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30:1606–1613.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:13427–13431.
- von Bartheld C (2002) Counting particles in tissue sections: choices of methods and importance of calibration to minimize biases. *Histol. Histopathol*. 17:639–648.
- von Bohlen und Halbach O (2005) The renin-angiotensin system in the mammalian central nervous system. *Curr Protein Pept Sci*. 6:355–371.
- von Bohlen und Halbach O (2011) Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*. 345:1–19.
- von Bohlen und Halbach O, Albrecht D (2006). The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res*. 326:599–616.
- von Bohlen und Halbach O, Minichiello L, Unsicker K (2003) Haploinsufficiency in trkB and/or trkC neurotrophin receptors causes structural alterations in the aged hippocampus and amygdala. *Eur. J. Neurosci*. 18:2319–2325.
- von Bohlen und Halbach O, Minichiello L, Unsicker K (2005) Haploinsufficiency for trkB and trkC receptors induces cell loss and accumulation of alpha-synuclein in the substantia nigra. *FASEB. J*. 19:1740–1742.
- von Bohlen und Halbach O, Walther T, Bader M, Albrecht D (2001) Genetic deletion of angiotensin AT2 receptor leads to increased cell numbers in different brain structures of mice. *Regul. Pept*. 99:209–216.
- von Bohlen und Halbach O, Hinz U, Unsicker K, Egorov AV (2005) Distribution of TRPC1 and TRPC5 in medial temporal lobe structures of mice. *Cell Tissue Res*. 322:201–206.
- Walther T, Balschun D, Voigt JP, Fink H, Zuschratter W, Birchmeier C, Ganter D, Bader M (1998) Sustained long-term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem*. 273:11867–11873.

- Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M (1986) Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell*. 45:711–719.
- Zhang F, Hu Y, Xu Q, Ye S (2010) Different effects of angiotensin II and angiotensin-(1–7) on vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *PLoS One* 5:e12323.
- Zhao M, Li D, Shimazu K, Zhou YX, Lu B, Deng CX (2007) Fibroblast growth factor receptor-1 is required for long term potentiation, memory consolidation, and neurogenesis. *Biol Psychiatry*. 62:381–390.
- Zhu XJ, Hua Y, Jiang J, Zhou QG, Luo CX, Han X, Lu YM, Zhu DY (2006) Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide inhibits neurogenesis in the adult dentate gyrus by down-regulating cyclic AMP response element binding protein phosphorylation. *Neuroscience*. 141:827–836.

6 Zusammenfassung

Neben dem bekannten biologisch-aktiven Angiotensin II sind andere biologisch-aktive Angiotensine wie das Angiotensin IV und Angiotensin (1-7) entdeckt worden. Vor einigen Jahren wurde herausgefunden, dass das Mas-Protoonkogen für einen Rezeptor kodiert, welcher essentiell für den Angiotensin (1-7)-Signalweg ist. Dieses wird nicht nur in der Peripherie, sondern auch im Gehirn exprimiert. Hierauf basierend untersuchten wir die Verteilung von Mas innerhalb des Gehirns der Maus mithilfe eines Antikörpers, welcher gegen die 3. zytoplasmatische Schleife des Rezeptors gerichtet ist. Die stärkste Expression wurde im Gyrus dentatus sowie im piriformen Cortex detektiert. Jedoch wurden ebenfalls Mas-positive Neurone in vielen Bereichen des Cortex, des Hippocampus, der Amygdala, den Basalganglien, dem Thalamus und dem Hypothalamus gefunden. Da der Gyrus dentatus zur adulten Neurogenese fähig ist, untersuchten wir den Einfluss der Deletion von Mas auf eben diese. Im Gyrus dentatus beeinflusste die Deletion von Mas weder die Zellproliferation (nachgewiesen durch Phosphohistone H3) noch den Zelltod (nachgewiesen durch aktivierte Caspase3). Jedoch resultierte der Knockout von Mas in einer Erhöhung Doublecortin-positiver Zellen. In Bezug auf den piriformen Cortex wird diskutiert, ob dieser unter physiologischen Gesichtspunkten zur adulten Neurogenese fähig ist. Wir konnten demonstrieren, dass der Mas-Knockout einen Einfluss auf die Zellteilung und die Population Doublecortin-positiver Neurone hat. Da Mas nicht vor dem ersten postnatalen Tag exprimiert wird, lassen unsere Daten vermuten, dass adulte hippocampale Neurogenese und die Neurogenese in der pränatalen Entwicklung mehrere gemeinsame Mechanismen besitzen. Darüber hinaus, da der Knockout von Mas die Zahl Doublecortin-positiver Neurone erhöht, könnte die Blockade von Mas hilfreich sein bei der Stimulation der Neurogenese beim Erwachsenen.

7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

8 Tabellarischer Lebenslauf

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Oliver von Bohlen und Halbach für die interessante Auswahl und Überlassung des Dissertationsthemas, die Ermöglichung der Experimente und für die hervorragende Unterstützung über den gesamten Zeitraum der Arbeit.

Weiterhin danke ich Frau Hanisch für ihre kompetente und exzellente Hilfe in allen labortechnischen Fragen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und insbesondere meinen Eltern, die die Grundsteine für meinen weiteren Werdegang gelegt und mich während des gesamten Studiums unterstützt haben.

10 Anhang

- **Freund M**, Walther T, von Bohlen und Halbach O (2012): Immunohistochemical localization of the Angiotensin (1-7)-binding Receptor Mas in the murine brain. *Cell Tissue Res.* 348:29-35.
- **Freund M**, Walther T, von Bohlen und Halbach O (2014): Effects of the angiotensin-(1-7) receptor Mas on cell proliferation and on the population of doublecortin positive cells within the dentate gyrus and the piriform cortex. *European Neuropsychopharmacology*. 24:302-8.

Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1–7) receptor Mas in the murine forebrain

M. Freund · T. Walther · O. von Bohlen und Halbach

Received: 5 January 2012 / Accepted: 28 January 2012 / Published online: 25 February 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Apart from the well-known biologically active angiotensin II, other biologically active angiotensins have been discovered, including angiotensin IV and angiotensin-(1–7). Some years ago, we and others discovered that the *Mas* proto-oncogene encodes a receptor that is essential for angiotensin-(1–7) signaling. Angiotensin-(1–7) is not only expressed in the periphery but also within the brain. Based on that, we examined the distribution of Mas within the murine brain, using an antibody directed against the 3rd cytoplasmic loop of the receptor protein. Strongest Mas protein expression was detected in the dentate gyrus of the hippocampus and within the piriform cortex. However, Mas protein expression is not restricted to these areas, since Mas immunopositive neurons were also seen in different parts of the cortex, hippocampus, amygdala, basal ganglia, thalamus and hypothalamus. Based on the expression of Mas protein in the cortex and the limbic system, angiotensin-(1–7) signaling may play a role in synaptic plasticity, learning, memory and emotion, as has been described for angiotensin II and IV.

Keywords Immunohistochemistry · Protein expression · Renin angiotensin system · Mouse · Knockout

Introduction

The renin–angiotensin system (RAS) is known to play key roles in regulation of cardiovascular, body fluid and electrolyte homeostasis in the periphery. However, a specific RAS also exists within the brain. The most important effector peptide of the RAS is angiotensin (Ang) II, which mainly acts through activation of AT1 and AT2 receptors. Apart from the well-known biologically active Ang II, further biologically active angiotensins have been identified in the brain, including Ang-(1–7) and Ang IV (von Bohlen und Halbach 2005). Earlier data suggest tissue-specific processing of angiotensins, with Ang-(1–7) being a predominant angiotensin peptide in the central nervous system (Chappell et al. 1989).

Ang-(1–7) immunoreactivity has been detected in a variety of brain areas (Block et al. 1988; Chappell et al. 1989). Although Ang-(1–7) is as potent as Ang II in stimulating release of vasopressin from superfused hypothalamo-neurohypophyseal explants, the heptapeptide has no dipsogenic or vasoconstrictor activity (Ferrario et al. 1990). In addition, Ang-(1–7) infusion has been found to increase blood flow to the brain (Sampaio et al. 2003). It has been reported that neither AT1 receptor antagonists nor AT2 receptor antagonist can block Ang-(1–7) mediated effects (Santos and Campagnole-Santos 1994), lending support for speculations that Ang-(1–7) may signal through specific receptors, different from AT1 and AT2. Further support for this speculation came from the synthesis of a specific Ang-(1–7) antagonist (Santos et al. 1994).

The *Mas* proto-oncogene was initially isolated, cloned and characterized in 1986 (Young et al. 1986). The gene codes for an G protein-coupled receptor with seven transmembrane domains (Brown 1989) and has been originally

M. Freund · O. von Bohlen und Halbach (✉)
Institute of Anatomy and Cell Biology, Universitätsmedizin
Greifswald, Ernst Moritz Arndt University of Greifswald,
Friedrich-Löffler-Straße-23c,
17487 Greifswald, Germany
e-mail: ovbohlen@uni-greifswald.de

T. Walther
Centre Cardiovascular and Metabolic Research (CCMR),
Hull York Medical School, University of Hull,
Hull HU6 7RX, UK

discussed to be a receptor for Ang II (Jackson et al. 1988). In 2003, Mas was identified as an endogenous receptor for Ang-(1–7) (Santos et al. 2003). The Mas-gene product is expressed in cerebral endothelial and in neuronal cells (Kumar et al. 1996), as well as in different peripheral tissues (Metzger et al. 1995; Alenina et al. 2008). In the brain, *Mas* mRNA has been detected, for example, within the hippocampus, piriform cortex and amygdala (Bunnemann et al. 1990; Martin et al. 1992; Metzger et al. 1995). Moreover, it has been shown that *Mas* mRNA is not detected before postnatal day 1 (P1) in the rat brain (Martin et al. 1992), indicating that it may play a role in the maintenance of the postnatal brain and/or in neuronal plasticity.

In 2007, it has been shown that Mas protein is expressed in several brain areas of the adult rat brain, mainly in areas related to cardiovascular functions but also in some other areas, like cortex, hippocampus, amygdala and thalamus (Becker et al. 2007). However, Mas does not only have a role in cardiovascular functions, since there are reports that, at least in mice, Mas also plays a role in neuronal signaling (Metzger et al. 1995; von Bohlen und Halbach et al. 2000; Hellner et al. 2005).

Based on that and on the availability of *Mas*-deficient mice (Walther et al. 1998), we determined the distribution of Mas protein within the forebrain of adult mice by immunohistochemistry.

Materials and methods

Animals

Adult male wildtype mice ($n=5$) and age- and gender-matched *Mas*-deficient mice ($n=2$) (Walther et al. 1998) were used for the analysis. Animals were euthanized and intracardial perfused with phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min and after that with 4% paraformaldehyde (PFA) as described before (von Bohlen und Halbach et al. 2005). The brains were removed and postfixed in 4% PFA. Coronal sections (30 μ m) were prepared by using a vibratome (VT 1000 S; Leica, Germany).

Immunohistochemistry

Sections were mounted on gelatine-coated slides and dried overnight at 37°C. On the next day, the sections were rehydrated and microwaved for antigen retrieval. After washing with water and PBS, sections were incubated in blocking solution (1% BSA and 0.1% Triton ×100) at room temperature (RT) for 60 min. Afterwards, sections were incubated with the primary antibody (rabbit anti-Mas 1:750 (AAR-013, Alomone Labs, Israel)) overnight at 4°C.

Sections were rinsed five times with PBS and afterwards incubated in a solution containing the secondary antibody (goat anti-rabbit Cy3 conjugated IgG (1:200)), for 1 h in the dark at RT. Thereafter, the sections were counterstained with 4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; 1:10000), washed and coverslipped.

Different control experiments were conducted: (i) omission of the primary antibody, (ii) preabsorption of the primary antibody by adding the corresponding immunization peptide (Alomone Labs) dissolved in PBS before immunohistochemical staining and (iii) use of brain tissue derived from *Mas*-deficient mice for *Mas*-immunohistochemistry.

Images were made using a software-controlled (Axiovision 4.0; Zeiss, Germany) digital camera (AxioCam; Zeiss) attached to a microscope (Axioplan 2; Zeiss), stored onto hard disc and analyzed off-line. For analysis, images were taken and optical densities (OD) were estimated per brain area by using ImageJ (NIH, USA). The OD was grouped into three categories: low (+), moderate (++) and high (+++). For determination of OD, the following parameters were controlled: exposure to fluorescent light, illumination time, threshold and gamma-correction. The nomenclature of brain structures used is according to the third edition of the mouse brain atlas (Franklin and Paxinos 2008).

Results

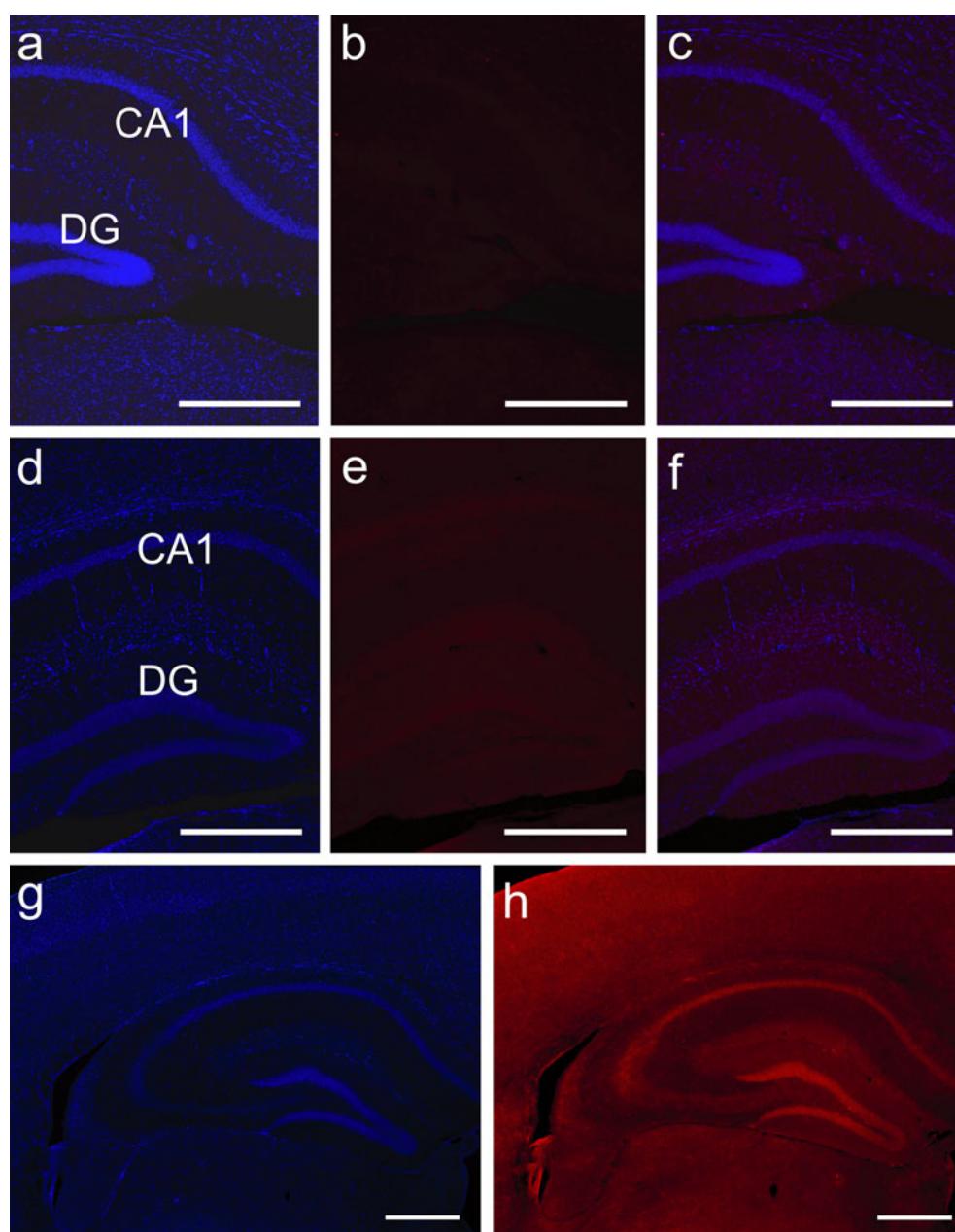
Omission of the primary antibody did not reveal any specific staining (not shown). Furthermore, in experiments that were conducted in the presence of the control peptide, no specific staining was seen (Fig. 1a–c). Likewise, no specific staining was seen by using the antibody on tissue derived from *Mas*-deficient mice (Fig. 1e–f).

In wild-type brains, protein expression of Mas is mainly restricted to neuronal cells (Fig. 1g–h) but also some non-neuronal cells express Mas protein; thus blood vessels were also immunopositive for Mas protein (Fig. 2d). Mas protein was detected in most brain regions of the forebrain, including cortical, limbic, thalamic and hypothalamic areas. Moreover, Mas protein expression was detected in basal ganglia as well as in circumventricular organs.

Cortex

In most cortical areas, Mas protein was found to be expressed (Fig. 1h). Strong Mas protein expression was mainly found in layers II and III. In addition, in the primary auditory, the primary visual and the motor cortex, strong neuronal Mas protein expression was found in layer V. The cortical brain area that shows

Fig. 1 In experiments (see section: “Materials and methods”) that were conducted in the presence of the control peptide in excess, no specific staining was seen (**a** DAPI was used to counterstain cell nuclei, **b** red channel, **c** merged images). Likewise, the use of the antibody on brain sections from Mas-deficient mice did not result in a specific staining pattern (**d** DAPI was used to counterstain cell nuclei, **e** red channel, **f** merged images). Using the antibody on brain sections derived from wildtype mice resulted in an obvious labeling of neuronal cells within the brain (**g** DAPI was used to counterstain cell nuclei, **h** red channel, showing immunofluorescence for the Mas protein; for images shown in **g** and **h**, eight single images were taken and combined using the panorama stitching software Hugin (version: 2011.4.0). Scalebars 250 µm (**a–f**); 500 µm (**g–h**)



the strongest expression of Mas protein was the piriform cortex (Table 1; Fig. 2e).

Hippocampus

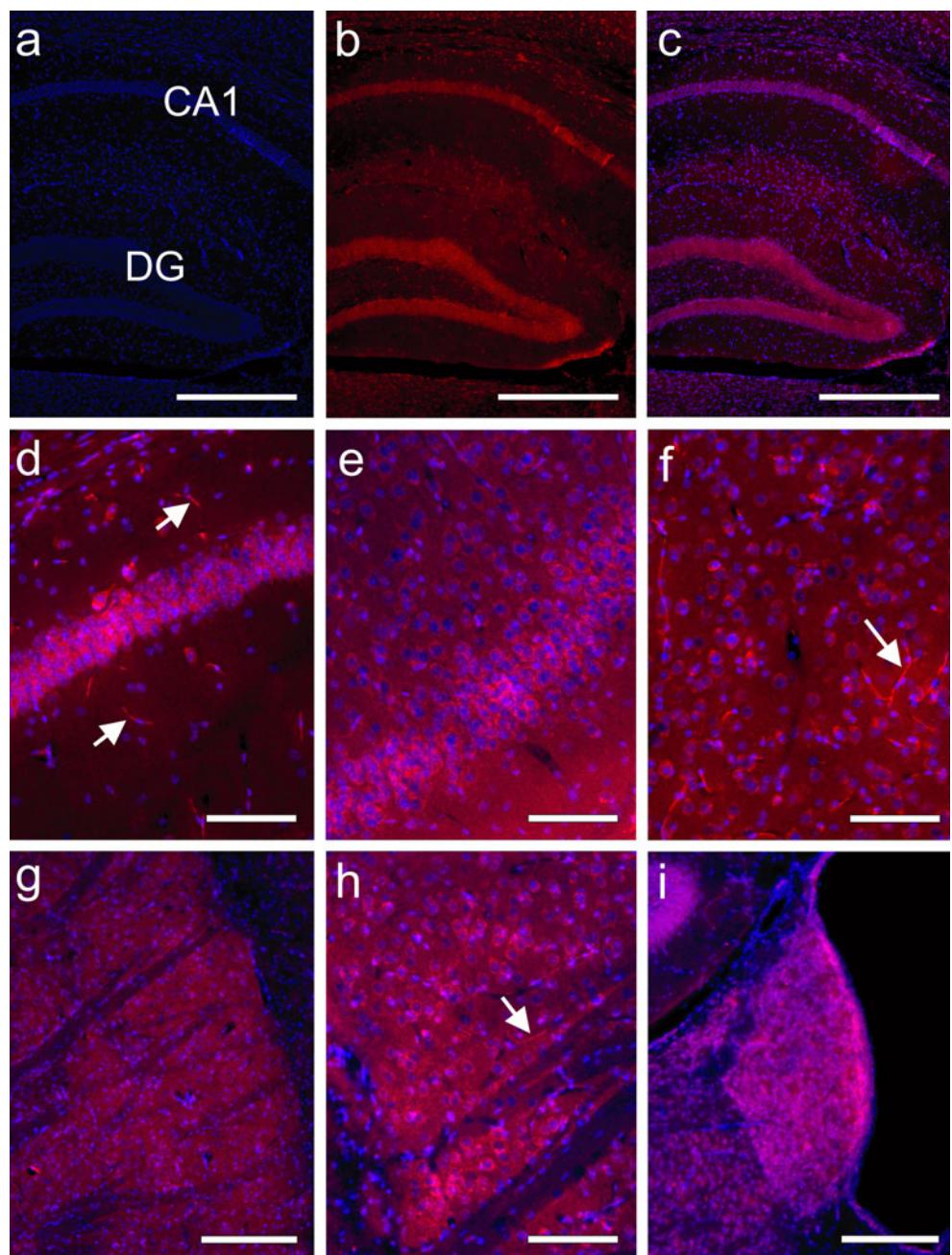
Mas protein expression was especially high within the granular layer of the dentate gyrus (DG) and the pyramidal layers of areas CA1–CA3 (Table 1). However, some cells expressing Mas protein were also detectable in the molecular layer of the DG as well as in the *Stratum radiatum* and *Stratum lacunosum-moleculare* of areas CA1–CA3 (Fig. 2a–c), which may represent

interneurons. In addition, not only in the hippocampus but also in other brain areas, Mas protein was expressed by blood vessels (Fig. 2d).

Amygdala

Mas protein was detected also within the amygdala; however, Mas protein expression was not as prominent as, for example, in the piriform cortex or in the pyramidal or granular layers of the hippocampus. Mas protein expression was detected in the basolateral amygdala, including the basolateral, basomedial and lateral nucleus (Fig. 2f), as well as in the central and

Fig. 2 Mas protein is expressed within the hippocampus (**a** DAPI was used to counterstain cell nuclei, **b** red channel, showing immunofluorescence for the Mas protein, **c** merged images). Mas protein was mainly found to be expressed by neurons in area CA1 (**d**); however, Mas protein was also found to be expressed by small blood vessels (*arrows*). In addition, within the piriform cortex (**e**), a high number of neurons were immunopositive for Mas; however, the staining intensity was much weaker as seen, for example, in neurons of the hippocampal formation. Mas protein expression was also mapped to different nuclei of the amygdala, including the lateral nucleus of the amygdala (**f**). Mas protein was also detected in basal ganglia, such as, for example, the striatum (**g** overview; **h** higher magnification) and in the thalamus, including the habenula (**i**). [**d–i** DAPI was used to counterstain cell nuclei (*in blue*); immunofluorescence for Mas is shown *in red*; Mas protein expression in blood vessels is indicated by *arrows*]. Scalebars 250 µm (**a–c**); 100 µm (**d–f, h**), 200 µm (**g, i**)



medial nucleus of the amygdala. Furthermore, Mas protein expression was found in different cortical amygdaloid nuclei (such as, for example, the anterior cortical nucleus, posterior cortical nucleus and cortical nucleus). The highest expression of Mas protein within the amygdala was seen in the intercalated nucleus of the amygdala (Table 1).

Basal ganglia

Within the basal ganglia, Mas protein expression was not only found in the caudate putamen (Fig. 2g,h), globus pallidus and the subthalamic nucleus but also within the substantia nigra (Table 1).

Thalamus

In several areas of the thalamus, no Mas protein expression was detected. In other thalamic areas such as the laterodorsal thalamic nucleus, as well as in others (see Table 1), moderate expression of Mas protein was found. The strongest Mas immuno-reactivity was found within the habenula (Fig. 2i).

Hypothalamus

Throughout the whole hypothalamus, Mas immunoreactivity was detectable. Only the medial part of the tuberal region

Table 1 Mas-receptor expression in the postnatal forebrain

Area	Region	Protein expression
Cortex	Auditory (primary) cortex	+
	Cingulated cortex	+
	Entorinal cortex	+
	Motor cortex	+
	Piriform cortex	+++
	Retrosplenial cortex	+
	Somatosensory (primary) cortex	+
	Somatosensory (secondary) cortex	+
	Visual (primary) cortex	+
Hippocampus	CA1, CA2 (pyramidal layer)	++
	CA3 (pyramidal layer)	+
	Dentate gyrus (granular layer)	+++
Amygdala	Basolateral nucleus	+
	Basomedial nucleus	+
	Central nucleus	+
	Cortical nuclei	+
	Intercalated nucleus	++
	Lateral nucleus	+
Basal ganglia	Medial nucleus	+
	Caudate putamen	++
	Globus pallidum	++
	Ncl. Subthalamicus	+
Thalamus	Substantia nigra	+
	Anterodorsal thalamic nucleus	+
	Anteromedial thalamic nucleus	+
	Central medial thalamic nucleus	+
	Centrolateral thalamic nucleus	+
	Habenula	++
	Lateral dorsal thalamic nucleus	+
	Lateral geniculate nucleus	+
	Lateral posterior thalamic nucleus	+
	Medial geniculate nucleus	+
	Paracentral thalamic nucleus	+
	Paraventricular thalamic nucleus	+
Hypothalamus	Submedius thalamic nucleus	+
	Arcuate hypothalamic nucleus	+
	Circular nucleus	+
	Dorsomedial hypothalamic nucleus	+
	Lateral hypothalamic area	+
	Mammillary nucleus	+
	Paraventricular hypothalamic nucleus	+
	Periforniculär nucleus	+
	Periventricular hypothalamic nucleus	+
	Preoptic hypothalamic nucleus	+
	Supraoptic nucleus	+
	Subparaventricular zone of the hypothalamus	+
	Tuberal region of the lateral hypothalamus	++
	Ventromedial hypothalamic nucleus	+
Circumventricular organs	Subfornical organ	+
	Subcommissural organ	+

Protein expression (staining intensity): +: weak, ++: moderate, +++: strong

of the lateral hypothalamus showed a moderate staining intensity, whereas the other hypothalamic areas were only weakly stained (Table 1).

Circumventricular organs

The circumventricular organs (CVOs), namely the subformical organ and the subcommissural organ, which are positioned around the margin of the third ventricle and have an incomplete blood–brain barrier, contain Mas-protein-expressing cells (Table 1).

Discussion

In general, Mas protein is widely distributed throughout the forebrain in mice. The expression of Mas protein was mainly restricted to neuronal cells. Previous *in-situ* hybridization studies have revealed that Mas mRNA is highly enriched in the hippocampal formation, including the dentate gyrus (DG) and areas CA1–CA3 (Bunnemann et al. 1990; Martin et al. 1992). Comparable to these findings, we found that Mas protein is highly expressed in the hippocampal formation. In addition, we found immuno-positive cells in different areas of the amygdala. Both the hippocampus and the amygdala belong to the limbic system. With regard to the presence of Mas protein in the limbic system, it has been shown, by using Mas-deficient mice, that Mas is involved in neuronal functions. Ang-(1–7) increases the excitability of neurons in area CA1 of the hippocampus (Hellner et al. 2005) and enhances hippocampal long-term potentiation (LTP) within area CA1, whereas Mas-deficient mice did not show an Ang-(1–7) induced enhancement of hippocampal LTP (Hellner et al. 2005). These results hint at a role of Ang-(1–7) and its cognate receptor in mechanisms attributed to learning and memory. However, Mas may not only represent an receptor for Ang-(1–7) but may also be able to hetero-oligomerize with the AT1 receptor and thereby inhibit the actions of Ang II (Kostenis et al. 2005). Along this line, it has been shown that mice lacking the *Mas* proto-oncogene displayed an opposite action of Ang II, at least in the amygdala, in comparison to wildtype mice, providing *in vitro* evidence for a functional interaction between Mas and the AT1 receptor (von Bohlen und Halbach et al. 2000). Moreover, functional interaction of the Ang-(1–7) receptor Mas with AT1 receptors has been described for the mouse heart (Castro et al. 2005), leading to the release of prostaglandins and nitric oxide. However, Mas may not only lead to the release of nitric oxide by interacting with AT1 receptors but also be capable of directly acting on nitric oxide (NO) formation (Gwathmey et al. 2010). Within the amygdala, Ang-(1–7) is capable of increasing LTP and data hint that this effect is mediated by nitric oxide, since blockage of

NO-synthesis with L-NAME resulted in a blockage of the Ang-(1–7)-mediated increase in LTP (Albrecht 2007).

Within the hippocampus, strong Mas immunoreactivity has been detected in the DG. Targeted disruption of the *Mas* proto-oncogene has been described to increase the durability of LTP in the DG (Walther et al. 1998). The DG is further known as a region capable of adult neurogenesis (von Bohlen und Halbach 2011). In this context, it may be speculated that Mas, via Ang-(1–7), may have a role in regulating neurogenesis. Indeed, it is possible that Ang-(1–7) via its receptor may inhibit adult neurogenesis, since Ang-(1–7) inhibits growth of cardiac myocytes (Freeman et al. 1996) through activation of the Mas receptor (Tallant et al. 2005). Since NO is capable of inhibiting neurogenesis (Zhu et al. 2006) and Mas can interact with the NO-system (see above), Mas may directly as well as indirectly lead to the formation of nitric oxide, which in turn inhibits neurogenesis. Together with the fact that *Mas*-deficient mice display increased durability of LTP in the DG (Walther et al. 1998), Mas may play a crucial role in hippocampal neuronal plasticity.

Apart from the hippocampus, prominent staining for Mas was found within the piriform cortex. It is speculated that the piriform cortex may also be capable of adult neurogenesis (Pekcec et al. 2006; Rivers et al. 2008) and of LTP (Jung and Larson 1994). Thus, it may be possible that Ang-(1–7) via its receptor may induce effects comparable to those seen in the hippocampus.

Finally, it should be mentioned that Mas immunoreactivity has been detected in several blood vessels. The presence of *Mas* in cerebral blood vessels was first described in 1996 by Northern blot analysis and the Mas-expressing cells have been identified as microvessel endothelial cells (Kumar et al. 1996). Thus, it can be speculated that Mas may have a role in maintaining vasorelaxant properties and in vasoprotection (Peiro et al. 2007; Tesanovic et al. 2010) within the brain.

Taken together, our results demonstrate that Mas protein is expressed in a variety of brain structures within the adult murine forebrain. Mas protein is expressed in limbic systems and it has been shown that Ang-(1–7) plays important roles in neuronal plasticity in these areas.

Acknowledgements The study was supported by a grant from the “Forschungsverbund Neurowissenschaften Greifswald”. We wish to thank Mrs. Hanisch for excellent technical assistance.

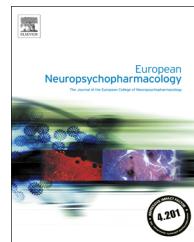
References

- Albrecht D (2007) Angiotensin-(1–7)-induced plasticity changes in the lateral amygdala are mediated by COX-2 and NO. Learn Mem 14:177–184

- Alenina N, Xu P, Rentzsch B, Patkin EL, Bader M (2008) Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1–7). *Exp Physiol* 93:528–537
- Becker LK, Etelvino GM, Walther T, Santos RA, Campagnole-Santos MJ (2007) Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H1416–H1424
- Block CH, Santos RA, Brosnihan KB, Ferrario CM (1988) Immunocytochemical localization of angiotensin-(1–7) in the rat forebrain. *Peptides* 9:1395–1401
- Brown K (1989) Angiotensin receptors are implicated in the mechanism of *mas* action. *TIPS* 10:87–89
- Bunnemann B, Fuxe K, Metzger R, Mullins J, Jackson TR, Hanley MR, Ganter D (1990) Autoradiographic localization of mas-proto-oncogene mRNA in adult rat brain using *in situ* hybridization. *Neurosci Lett* 114:147–153
- Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP (2005) Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1–7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension* 46:937–942
- Chappell MC, Brosnihan KB, Diz DI, Ferrario CM (1989) Identification of angiotensin-(1–7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *J Biol Chem* 264:16518–16523
- Ferrario CM, Barnes KL, Block CH, Brosnihan KB, Diz DI, Khosla MC, Santos RA (1990) Pathways of angiotensin formation and function in the brain. *Hypertension* 15:I13–I19
- Franklin KBJ, Paxinos G (2008) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego
- Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, Tallant EA (1996) Angiotensin-(1–7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 28:104–108
- Gwathmey TM, Westwood BM, Pirro NT, Tang L, Rose JC, Diz DI, Chappell MC (2010) Nuclear angiotensin-(1–7) receptor is functionally coupled to the formation of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:F983–F990
- Hellner K, Walther T, Schubert M, Albrecht D (2005) Angiotensin-(1–7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Mol Cell Neurosci* 29:427–435
- Jackson TR, Blair LAC, Marshall J, Goedert M, Hanley MR (1988) The *mas* oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 335:437–440
- Jung MW, Larson J (1994) Further characteristics of long-term potentiation in piriform cortex. *Synapse* 18:298–306
- Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP, Walther T (2005) G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 111:1806–1813
- Kumar M, Grammas P, Giacomelli F, Wiener J (1996) Selective expression of c-mas proto-oncogene in rat cerebral endothelial cells. *NeuroReport* 8:93–96
- Martin KA, Grant SG, Hockfield S (1992) The mas proto-oncogene is developmentally regulated in the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 68:75–82
- Metzger R, Bader M, Ludwig G, Berberich C, Bunnemann B, Ganter D (1995) Expression of the mouse and rat *mas* proto-oncogene in the brain and peripheral tissue. *FEBS* 357:27–32
- Pérez C, Vallejo S, Gembardt F, Azcutia V, Heringer-Walther S, Rodriguez-Manas L, Schultheiss HP, Sanchez-Ferrer CF, Walther T (2007) Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function. *J Hypertens* 25:2421–2425
- Pekcec A, Loscher W, Potschka H (2006) Neurogenesis in the adult rat piriform cortex. *NeuroReport* 17:571–574
- Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, Kessaris N, Richardson WD (2008) PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci* 11:1392–1401
- Sampaio WO, Nascimento AA, Santos RA (2003) Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1–7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H1985–H1994
- Santos RA, Campagnole-Santos MJ (1994) Central and peripheral actions of angiotensin-(1–7). *Braz J Med Biol Res* 27:1033–1047
- Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Baracho NC, Fontes MA, Silva LC, Neves LA, Oliveira DR, Caligiorne SM, Rodrigues AR, Gropen JC (1994) Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1–7): evidence that the actions of angiotensin-(1–7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull* 35:293–298
- Santos RA, Simões e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T (2003) Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8258–8263
- Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE (2005) Angiotensin-(1–7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H1560–H1566
- Tesanovic S, Vinh A, Gaspari TA, Casley D, Widdop RE (2010) Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1–7) in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1606–1613
- von Bohlen und Halbach O (2005) The renin-angiotensin system in the mammalian central nervous system. *Curr Protein Pept Sci* 6:355–371
- von Bohlen und Halbach O (2011) Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 345:1–19
- von Bohlen und Halbach O, Walther T, Bader M, Albrecht D (2000) Interaction between *Mas* and the angiotensin AT1 receptor in the amygdala. *J Neurophysiol* 83:2012–2021
- von Bohlen und Halbach O, Hinz U, Unsicker K, Egorov AV (2005) Distribution of TRPC1 and TRPC5 in medial temporal lobe structures of mice. *Cell Tissue Res* 322:201–206
- Walther T, Balschun D, Voigt J-P, Fink H, Zuschratter W, Birchmeier C, Ganter D, Bader M (1998) Sustained long-term potentiation and anxiety in mice lacking the *Mas* protooncogene. *J Biol Chem* 273:11867–11873
- Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M (1986) Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 45:711–719
- Zhu XJ, Hua Y, Jiang J, Zhou QG, Luo CX, Han X, Lu YM, Zhu DY (2006) Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide inhibits neurogenesis in the adult dentate gyrus by down-regulating cyclic AMP response element binding protein phosphorylation. *Neuroscience* 141:827–836



ELSEVIER

www.elsevier.com/locate/euroneuro

Effects of the angiotensin-(1-7) receptor Mas on cell proliferation and on the population of doublecortin positive cells within the dentate gyrus and the piriform cortex

M. Freund^a, T. Walther^{b,c,d}, O. von Bohlen und Halbach^{a,*}

^aInstitute of Anatomy and Cell Biology, Universitätsmedizin Greifswald, Friedrich Löffler Straße 23c, 17487 Greifswald, Germany

^bDepartment of Pharmacology and Therapeutics, University College Cork, Cork, Ireland

^cDepartment of Pediatric Surgery, Centre for Fetal Medicine, Division of Women and Child Health, University of Leipzig, Leipzig, Germany

^dDepartment of Obstetrics, Centre for Fetal Medicine, Division of Women and Child Health, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Received 25 January 2013; received in revised form 19 June 2013; accepted 23 June 2013

KEYWORDS

Abercrombie's;
Doublecortin;
Hippocampus;
Immunohistochemistry;
Knockout;
Mice

Abstract

Aside from the well-known biologically active angiotensin II, other biologically active angiotensins have been discovered, including angiotensin IV and angiotensin-(1-7). Some years ago, we and others discovered that the Mas proto-oncogene encodes a G protein-coupled receptor being essential for angiotensin-(1-7) signaling. Mas is not only expressed in the periphery but also within the brain, e.g. in the dentate gyrus (DG) and the piriform cortex (PC). Since the DG is capable of adult neurogenesis, we examined the impact of a deletion of Mas upon adult neurogenesis. Deletion of Mas did not alter cell proliferation in the adult DG (as monitored with phosphohistone H3) and did not alter cell death (as monitored with activated Caspase 3). However, Mas deficiency resulted in an increase in the number of doublecortin (DCX) positive cells, indicating that lack of Mas increases the number of this cell population. Concerning the PC, it is discussed whether adult neurogenesis occurs under physiological conditions in this area. We could demonstrate that Mas deficiency has an impact on cell division and on the population of DCX-positive cells within the PC. Since Mas is not expressed before birth within the brain, our data may suggest that adult hippocampal neurogenesis and neurogenesis occurring during prenatal development share several

*Corresponding author. Tel.: +49 3834865313; fax: +49 3834865302.

E-mail addresses: oliver.vonbohlen@uni-greifswald.de, oliver.vonbohlen@arcor.de (O. von Bohlen und Halbach).

common mechanisms, but are, at least in part, differentially regulated. Moreover, since deficiency for Mas increases the numbers of DCX-positive young neurons, blockage of Mas might be beneficial in stimulating neurogenesis in adults.
 © 2013 Elsevier B.V. and ECNP. All rights reserved.

1. Introduction

The dentate gyrus (DG) is, aside from the subventricular zone (SVZ), capable of adult neurogenesis. The process of adult neurogenesis includes stages of proliferation, fate specification, neuronal maturation, targeting, and synaptic integration of the newborn neurons (von Bohlen und Halbach, 2011). Whether adult neurogenesis exists also in other brain areas is still a matter of debate. In the rat piriform cortex (PC) e.g. the expression of PSA-NCAM (Seki and Arai, 1991) and doublecortin (Nacher et al., 2001) persists in neurons into adulthood, and it is speculated that this expression might be linked to functional adult neurogenesis, and that the PC may also be capable of adult neurogenesis (Pekce et al., 2006). In addition, new neurons in the PC have not only been detected in rodents, but also in adult primates (Bernier et al., 2002). Neurogenesis within the PC may also have a neuroplastic role, since olfactory enrichment has been shown to increase differentiation and/or survival of newborn neurons in the PC (Shapiro et al., 2007). Furthermore, olfactory bulbectomy (an animal model of depression), but not odor conditioned aversion, has been found to induce differentiation of immature neurons in the adult rat PC (Gomez-Climent et al., 2011). However, it is also reported that immature neurons located in the PC are not related to adult neurogenesis (Klempin et al., 2011).

The brain renin-angiotensin system (RAS) generates different biological active forms of angiotensins within the brain, which can stimulate different receptors. The most important effector peptide of the RAS is angiotensin (Ang) II, which mainly acts through activation of AT1 and AT2 receptors. In the central nervous system further biologically active angiotensins have been identified, including e.g. Ang IV and Ang-(1-7) (von Bohlen und Halbach, 2005). In 2003, the G protein-coupled receptor Mas was identified as a receptor being essential for Ang-(1-7) signaling (Santos et al., 2003). Mas mRNA is not detectable before postnatal day 1 (P1) in the rat brain (Martin et al., 1992) and Mas protein is expressed in different brain areas of adult rats (Becker et al., 2007) and mice (Freund et al., 2012).

Within the hippocampus of mice, strong Mas immunoreactivity has been detected in the DG. Mas may play a role in neuronal signaling, not only in the amygdala (von Bohlen und Halbach et al., 2000), but also within the DG, since targeted disruption of the Mas protooncogene has been found to increase the durability of long-term potentiation (LTP) in the DG (Walther et al., 1998). Since neurons, located in the adult DG as well as in the adult PC, display prominent expression of the Mas receptor in mice (Freund et al., 2012), we examined whether deficiency in Mas may have an impact on cell proliferation within these brain regions, and whether deficiency in Mas may affect the population of immature neurons in these areas in adult mice.

2. Experimental procedures

2.1. Immunohistochemistry

Adult (4-month old) Mas-deficient mice (Walther et al., 1998) and age- and gender-matched wildtype littermates ($n=11$ for each group) that were obtained from heterozygous breeders, were used for the analysis. Mice were euthanized and then perfused transcardiacally perfused with phosphate-buffered saline (PBS) and 4% paraformaldehyde (PFA) as described previously in detail (von Bohlen und Halbach et al., 2003). Slices (30 μ m) where cut using a Vibratome (VT 1000S, Leica, Germany), stored in 20% ethanol and then incubated for 30 min in a solution with 0.4% Triton X-100 in PBS. After this, brain sections where incubated for 1 h in a blocking solution containing 0.3% Triton X-100 and 3% BSA (bovine serum albumin) in PBS. As primary antibodies, either rabbit α -Mas antibody (Alomone Labs, Israel (Freund et al., 2012)), rabbit α -phosphohistone H3 (pH3, sc-8656, Santa Cruz Biotechnology Inc., Germany), goat α -doublecortin (DCX, sc-8066, Santa Cruz Biotechnology Inc., Germany), or rabbit α -caspase3 (active (cleaved) form; AB3623, Millipore) were used. Anti-Mas antibodies were used in a 1:750 dilution in 0.1 Triton X-100 and 1% BSA in PBS (over night at 4 °C). The specificity of the Mas antibody has recently been demonstrated, e.g. by the use of tissue derived from Mas-deficient mice (Freund et al., 2012). Anti-caspase 3 antibodies were used in a 1:250 dilution in 0.1 Triton X-100 and 3% BSA in PBS (over night at 4 °C). Anti-doublecortin antibodies were used in a 1:100 dilution in 0.1 Triton X-100 and 3% BSA in PBS (over night at 4 °C). Anti-phosphohistone H3 antibodies were used in a 1:100 dilution in 0.1 Triton X-100 and 5% BSA in PBS (120 min at room temperature). For detecting the primary antibody we used a biotin/streptavidin system (secondary antibody:biotinylated α -goat or α -rabbit IgG (Vector Labs, USA) and Cy3- or Cy2-conjugated streptavidin; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Germany). DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; 1:10000) was used to detect the cell nuclei. Slices where then washed with PBS and mounted using the water-based mounting medium Mowiol (Roth, Germany).

For double labeling experiments, five adult (4-month old) control mice were used.

2.1.1. Double-labeling (pH3 and Mas or DCX and Mas)

Serial 30 μ m slices were mounted on gelatine-coated slides and dried over night. For antigen retrieval, slices were microwaved for 20 min. After rinsing, sections were incubated in a blocking solution. Sections were rinsed again. First, either mouse α -phosphohistone H3 antibodies (05-1336, monoclonal mouse IgG, Millipore, Germany; 1:200 in 0.1 Triton X-100 and 3% BSA in PBS; over night at 4 °C) or goat α -DCX antibodies (1:100 in 0.1 Triton X-100 and 3% BSA in PBS; for 3 days at 4 °C) were used. After three times of rinsing, Cy3-conjugated α -mouse IgG (1:200, for 2 h) was used for visualization (in case of pH3) or - in case of DCX immunohistochemistry - sections were incubated in a solution containing biotinylated α -goat IgG (1:200, for 2 h) and after rinsing the sections three times, they were incubated in a solution containing Cy3- or Cy2-conjugated streptavidin (1:2000 for 2 h). Sections were rinsed three times. Sections were incubated in a

solution containing rabbit α -Mas antibodies (rabbit α -Mas antibody (Alomone Labs, Israel); 1:750 dilution in 0.1 Triton X-100 and 3% BSA in PBS (over night at 4 °C). The sections were then rinsed three times and afterwards incubated in a solution containing Cy3- or Cy2-conjugated α -rabbit IgG (1:100 for 2 h). After rinsing the sections four times, they were transferred in a 1:10000 DAPI solution (for 5 min). After a final rinsing step, sections were embedded using Mowiol.

2.2. Estimation of cell numbers

To estimate the number of the labeled newly formed cells (or neurons) cell counts were performed for the whole brain. Since the size of neuronal nuclei was constant in the different groups, any potential bias should be identical or similar among the groups (Schober et al., 2007), counting was performed according to Abercrombie's correction formula. This method renders biases within the range of the optical disector or optical fractionator by taking into account that the particles counted are small compared with the section thickness (von Bartheld, 2002). Moreover, optical fractionator is not free of assumptions about the structure of the tissue and thus it should be kept in mind that the proliferating cells are clustered to a non-uniform and heterogeneous pattern; moreover, there is a probability that the disector might miss the proliferating cells (Noori and Fornal, 2011). Cell counts and Abercrombie's corrections were made as described before (von Bohlen und Halbach et al., 2005). In brief: cell counts were made from every third section. To account for the overcount due to the presence of split particles in the sections, counts were corrected using The Linderstrom-Lang/Abercrombie (LLA) equation (Hedreen, 1998):

$$N = n \times t(t + H) \text{ or } N/n = f = t/(t + H)$$

where N is an estimate of the number of objects in the defined region, n is the counted number of objects, t is the mean thickness of the virtual section, H is the mean height of the objects, and f is the conversion factor for converting n to N . In a first step, n was counted using a microscope (AxioPlan 2 imaging; Zeiss, Germany), connected to a digital camera (AxioCam HRC, Zeiss, Germany). In a second step, H , the height of the cells in the z-axis, was estimated using a computer-driven motorized stage connected to the microscope with the help of the software NeuroLucida (MBF Bioscience, USA), as well as the thickness (t) of the sections. No guard zones were used for the counting procedure, since we recently have shown that the use of guard zones can bias even optical disector counting (Baryshnikova et al., 2006). Statistical analysis (unpaired t -test) was done using the Prism 5.04 (Graph Pad Inc., USA). Data were expressed as mean \pm SEM. For power analysis and determination of sample sizes the software StatMate (GraphPad Inc., USA) was used.

3. Results

Since Mas is expressed within the DG, and since the DG is one of the brain areas capable of adult neurogenesis, we investigated whether Mas is found on dividing cells and/or on DCX expressing immature neurons. Concerning phosphohistone H3 (pH3; a marker for cell proliferation) and Mas, we identified expression of Mas protein on dividing cells (Fig. 1A-C). In addition, DCX-positive young neurons also express Mas protein (Fig. 1D-J). Next, we analyzed whether deficiency in Mas affects adult neurogenesis within the DG. pH3 was used as a marker to monitor cell proliferation. We found that Mas-deficient mice display an insignificant increase ($p=0.105$) in numbers of pH3 positive cells within

the DG (wild-type: 2932 ± 442 cells; knockout: 3954 ± 212 cells; Fig. 1K-M). However, it should be kept in mind that pH3, like Ki-67 or BrdU, is not a direct marker of proliferation in relation to neurogenesis, since these markers are only specific for proliferative events in general, regardless of the cell type. Thus, there is no major effect of Mas deficiency on general cell proliferation. Since doublecortin (DCX) is expressed by late mitotic active and early post-mitotic young neurons, we used this marker for investigating whether Mas deficiency influences this neuronal lineage. The comparison of Mas-deficient mice and their wild-type controls revealed that Mas-deficient mice have significantly more DCX-positive young neurons in the DG than their controls (wild-type: 8669 ± 168 ; knockout: 17676 ± 1953 DCX-positive cells; Fig. 1O-Q). However, it is known that many newborn neurons in the hippocampal DG undergo apoptosis (Sasaki et al., 2006) since the adult-generated neurons must integrate into mature neural circuits for their survival (Kim and Sun, 2011). Thus, it might be possible that an increase in the numbers of DCX-positive cells is paralleled by enhanced cell death. In order to investigate whether Mas deficiency also increases the rate of apoptosis, we determined the total number of caspase-3 positive cells in the DG. No significant change in the number of caspase-3 positive cells in the DG of Mas-deficient mice was detected compared to their control littermates (wild-type: 73.6 ± 1.34 ; knockout: 56.7 ± 10.2 caspase-3 positive cells, $p=0.18$).

Since Mas is expressed within the murine piriform cortex, and since it is discussed that neurogenesis might occur within the PC, we also analyzed this brain area in detail. In wild-type mice, pH3-positive cells were found to be immunopositive for Mas (Fig. 2A-C). However, some of the Mas and pH3 double-positive cells seem to localize to blood vessels (data not shown). Within the PC also, DCX positive cells can be found, and we could demonstrate as for DG that DCX-positive neurons were also positive for Mas protein (Fig. 2D-F). This prompted us to also analyze the number of PH3- and DCX-positive cells in the PC of Mas-deficient mice in comparison to their wild-type controls. Within the PC, the number of proliferating cells was significantly increased in Mas-deficient mice (2411 ± 145 to 4324 ± 71 cells; Fig. 2G-I). Importantly, this increase correlated with significantly increased numbers of newly generated young neurons in the Mas-deficient mice (1482 ± 24 vs. 2242 ± 62 DCX-positive cells; Fig. 2J-L). Concerning apoptotic cell death occurring in the PC, no statistically difference was found by comparing the number of caspase-3 stained cells of Mas-deficient mice with their age-matched control littermates (wild-type: 9.57 ± 2.65 ; knockout: 9.88 ± 2.84 caspase-3 positive cells, $p=0.94$). Thus, using this approach, we attempted to analyze differences in cell death and detected no change in the numbers of caspase-3 labeled cells. However, the authors are not able to finally exclude a minor but significant difference, but the illustration of this would exceed the number of 5000 brains to be investigated (calculated by using StatMate, GraphPad. Inc., USA).

4. Discussion

Since Ang-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes (Tallant et al., 2005) and vascular smooth muscle cells (Zhang et al.,

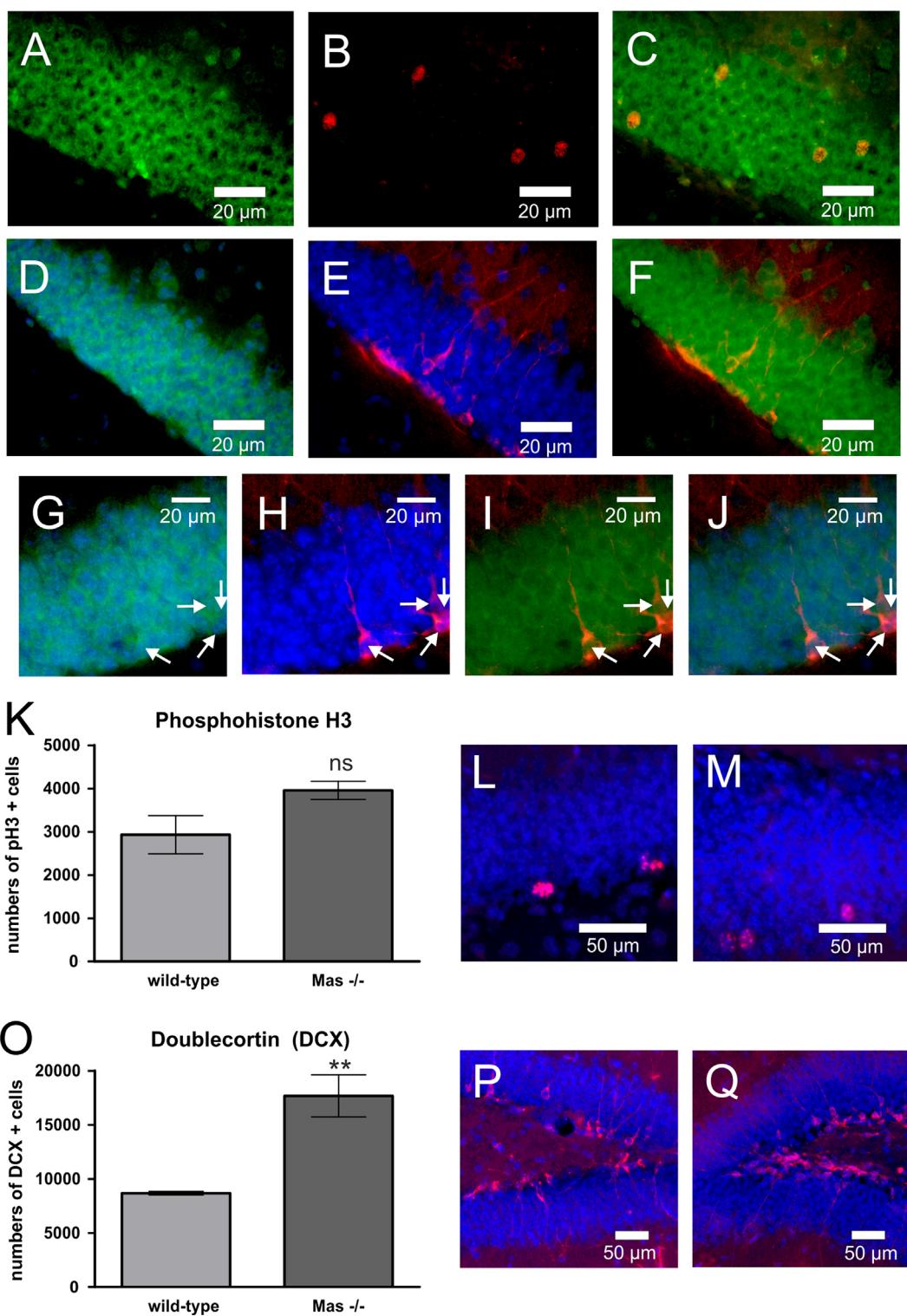


Figure 1 *Mas* protein (in green) is expressed in the DG (A, D, G) and several phosphohistone H3 (pH3, in red) positive cells could be detected (B). The pH3 positive cells were also immunopositive for *Mas* (C).

Mas positive cells within the DG (in green, D) and DCX positive cells (in red in the same section (E)). The overlay shows that DCX positive cells were also positive for *Mas* (F). Cell nuclei were labeled with DAPI (in blue; in D and E).

Overlays in a higher magnification: *Mas* positive cells within the DG (in green, G; DAPI (in blue) was used to visualize cell nuclei) and DCX positive cells (in red in the same section (H); DAPI (in blue) was used to visualize cell nuclei). The overlay shows that DCX positive cells were also positive for *Mas* (I, J). In (J) the same image is shown as in (I), but cell nuclei (in blue) were also visualized. No significant change in numbers of pH3 positive cells in the DG could be detected (K) by analyzing tissue from wild-type (L) and *Mas*^{-/-} mice (M). However, a significant difference in numbers of DCX positive cells in the DG could be detected (O) between tissue from wild-type (P) and *Mas*^{-/-} mice (Q). DAPI (in blue) was used to visualize cell nuclei.

(n.s.=not significant; **=p≤0.01).

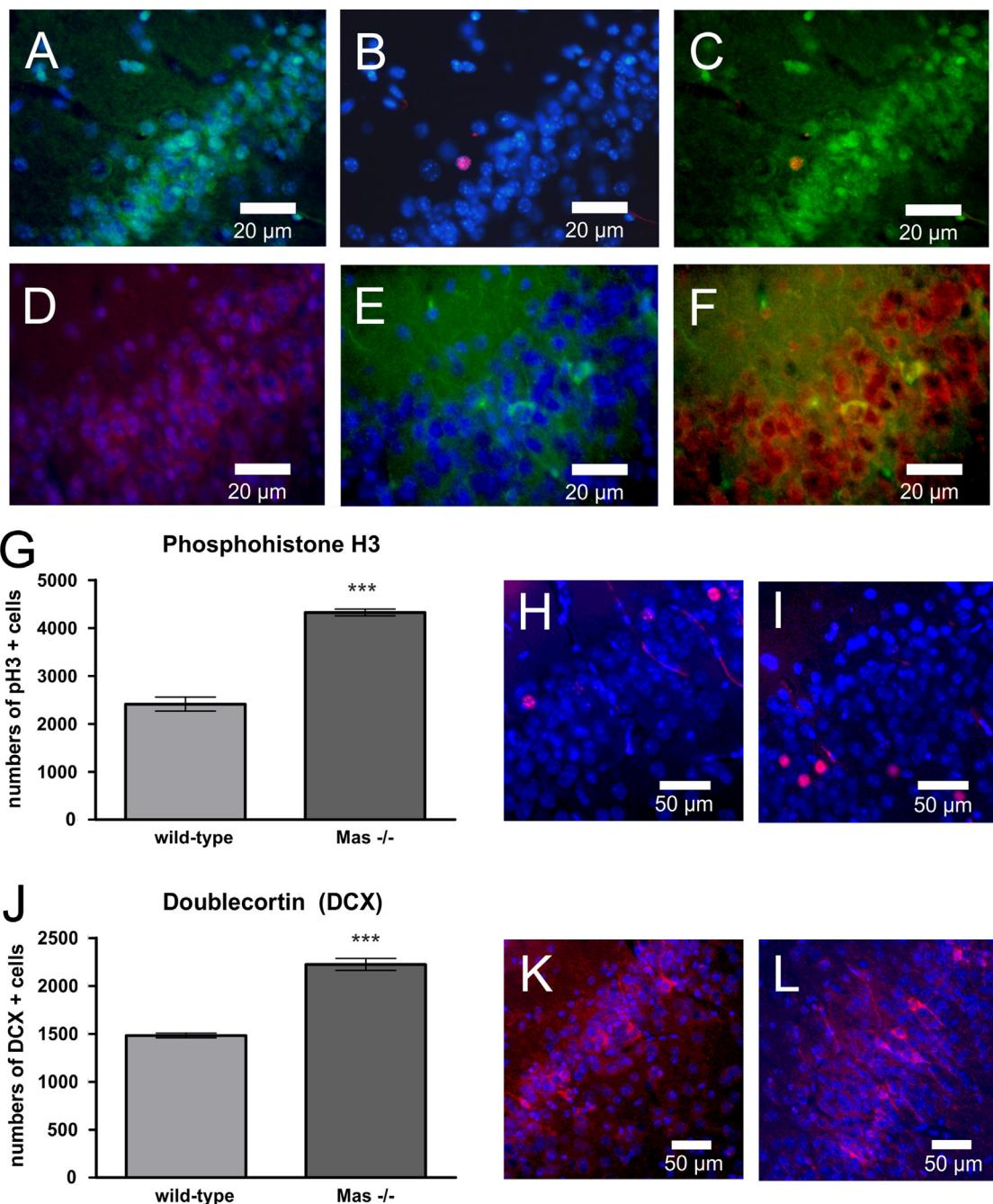


Figure 2 Mas protein is expressed in the piriform cortex (A, D) and several phosphohistone H3 (pH3) positive cells could be detected (B). The pH3 positive cells were also immunopositive for Mas (C). Several cells within the piriform cortex are immunopositive for Mas (D) as well as for doublecortin (DCX; E). The DCX-positive cells are also positive for Mas (F). A significant increase in numbers of pH3 positive cells in the piriform cortex could be detected in case of *Mas*^{-/-} mice (G) by analyzing tissue from wild-type (H) and *Mas*^{-/-} mice (I). A significant difference in numbers of DCX positive cells in the piriform cortex could be detected (J) by analyzing tissue from control wild-type (K) and *Mas*^{-/-} mice (L). DAPI (in blue) was used for visualization of cell nuclei.
(***)=p≤0.005).

2010) through activation of the Mas receptor, and since Mas has been found to be expressed in the murine DG and the PC (Freund et al., 2012), Ang-(1-7) may also affect via its receptor adult neurogenesis within the brain. To investigate a potential role of Mas in these areas, we examined cell proliferation and investigated the number of DCX-positive

neurons in these brain areas of mice being deficient in Mas. Such Mas-deficient mice have been described as displaying slight, but insignificant improved spatial learning in the Morris water maze test (Walther et al., 1998) and alterations in the Y-maze test (Lazaroni et al., 2012). However, these knockout mice display impaired novel and spatial

object recognition memories (Lazaroni et al., 2012), but enhanced long-term potentiation (LTP) within the DG (Walther et al., 1998). Thus, the enhanced LTP in the Mas deficient mice seems not to translate in enhanced whole animal behavior or enhanced spatial learning. Along this line, it has been shown that FgfR1 (fibroblast growth factor receptor 1) mutant mice display deficits in adult neurogenesis, accompanied by a severe impairment of LTP at the medial perforant path granule neuron synapses, but that these animals did not show significant deficits in spatial learning, but in memory consolidation (Zhao et al., 2007).

In 1999, it has been shown that there is a link between LTP, learning and neurogenesis (van Praag et al., 1999) and 2 years later, a causal relationship between neurogenesis and LTP has been confirmed (Snyder et al., 2001). On one hand, LTP enhances neurogenesis in the adult DG (Bruel-Jungerman et al., 2006), and on the other, neurogenesis affects LTP (Massa et al., 2011). Our new data illustrate now that Mas-deficient mice did not only display enhanced LTP, but also show morphological alteration within the adult DG. Within the DG, deficiency for Mas does not significantly affect cell proliferation. Lack of Mas, however, significantly alters the population of DCX-positive cells, indicating that Mas has a specific role for this neuronal population. The increase in the number of DCX-positive cells may either account for increased neurogenesis, or for an effect of Mas in the maturation rate of the DCX-positive cells. Thus, Mas may prolong the stage of immature newly formed neurons. However, both scenarios account for a role of Mas in adult neurogenesis.

It is thought that adult neurogenesis replicates several aspects of progenitor cell development in the embryonic brain (Hodge and Hevner, 2011). In this context it should be kept in mind that Mas is not expressed before birth (Martin et al., 1992). Thus, within the hippocampus, adult neurogenesis and neurogenesis occurring during development share several common mechanisms, but are, at least in part, differentially regulated.

Concerning the PC, the mechanisms for the induction and expression of LTP have been studied in detail (Jung and Larson, 1994), and it is currently discussed whether the PC is also capable of adult neurogenesis (Klempin et al., 2011; Pekce et al., 2006; Shapiro et al., 2007). Given that functional adult neurogenesis could take place within the PC, mechanisms or events that alter adult neurogenesis in the DG, may also have an impact on the PC. Deficiency for Mas induces a massive increase in the population of pH3 positive cells, indicating that Mas has an impact on cell proliferation in general, since using pH3 as a marker does not allow distinguishing between dividing neuronal or non-neuronal cells (including glia and blood vessels). In this context it should be mentioned that Mas also localizes to blood vessels within the brain (Freund et al., 2012; Kumar et al., 1996) and that inhibition of Ang-(1-7) is capable of inhibiting vascular growth (Tallant and Clark, 2003). Thus, an interesting topic for a future study might be the examination of effects induced by Mas deficiency on blood vessels in the brain as well as in the periphery.

Within the PC, DCX-positive cells were observed less frequently than in the DG. Nevertheless, a substantial number of DCX-positive cells can be detected. Moreover, we could demonstrate that deficiency for Mas induces an increase in DCX-positive neurons in this area (without a substantial change in cell death in this area), arguing for a regulation of the

DCX-positive neuronal population by the Ang-(1-7) receptor. However, neuronal densities within the piriform cortex of adult Mas-deficient mice seem to be unaltered (von Bohlen und Halbach et al., 2001). Within the DG, DCX is a reliable marker for the neuronal lineage (Knott et al., 2010; Plumpe et al., 2006; Steiner et al., 2006). Concerning the PC there are reports indicating that the piriform cortex is capable of adult neurogenesis and that DCX is a marker for the neuronal lineage (Guo et al., 2010; Pekce et al., 2006; Shapiro et al., 2007). However, there are also reports indicating that the piriform cortex is not capable of adult neurogenesis and that therefore, DCX-positive cells within the PC are not involved in neurogenesis (Klempin et al., 2011). These DCX positive cells may belong to a group of unusual immature, non-newly generated cortical neurons that are involved in not neurogenesis dependent structural plasticity (Bonfanti and Nacher, 2012) and may act as "standby" neurons (Kempermann, 2012). Thus, whether the DCX-positive cells are newly formed neurons that functionally integrate into the PC or postmitotic DCX-expressing neurons could not be answered by our approach, but would recommend detailed stereological investigation of the different neuronal populations within the PC and electrophysiological characterization of the population of DCX-positive cells.

Role of the funding source

This study was supported by a grant from the "Forschungsverbund Neurowissenschaften Greifswald". There is no financial interest associated with that grant.

Contributors

All authors contributed to and have approved the final manuscript.

Conflict of interest

We declare no conflict of interest.

Acknowledgment

This study was supported by a grant from the "Forschungsverbund Neurowissenschaften Greifswald". We wish to thank Mrs. Hanisch for her excellent technical assistance.

References

- Baryshnikova, L.M., von Bohlen und Halbach, O., Kaplan, S., von Bartheld, C.S., 2006. Two distinct events, section compression and loss of particles ("lost caps"), contribute to z-axis distortion and bias in optical disector counting. *Microsc. Res. Tech.* 69, 738-756.
- Becker, L.K., Etelvino, G.M., Walther, T., Santos, R.A., Campagnole-Santos, M.J., 2007. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H1416-1424.
- Bernier, P.J., Bedard, A., Vinet, J., Levesque, M., Parent, A., 2002. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11464-11469.
- Bonfanti, L., Nacher, J., 2012. New scenarios for neuronal structural plasticity in non-neurogenic brain parenchyma: the case of cortical layer II immature neurons. *Prog. Neurobiol.* 98, 1-15.

Effects of Mas on adult neurogenesis

- Bruel-Jungerman, E., Davis, S., Rampon, C., Laroche, S., 2006. Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J. Neurosci.* 26, 5888-5893.
- Freund, M., Walther, T., von Bohlen und Halbach, O., 2012. Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1-7) receptor Mas in the murine forebrain. *Cell Tissue Res.* 348, 29-35.
- Gomez-Clement, M.A., Hernandez-Gonzalez, S., Shionoya, K., Belles, M., Alonso-Llosa, G., Datiche, F., Nacher, J., 2011. Olfactory bulbectomy, but not odor conditioned aversion, induces the differentiation of immature neurons in the adult rat piriform cortex. *Neuroscience* 181, 18-27.
- Guo, F., Maeda, Y., Ma, J., Xu, J., Horiuchi, M., Miers, L., Vaccarino, F., Pleasure, D., 2010. Pyramidal neurons are generated from oligodendroglial progenitor cells in adult piriform cortex. *J. Neurosci.* 30, 12036-12049.
- Hedreen, J.C., 1998. Lost caps in histological counting methods. *Anat. Rec.* 250, 366-372.
- Hodge, R.D., Hevner, R.F., 2011. Expression and actions of transcription factors in adult hippocampal neurogenesis. *Dev. Neurobiol.* 71, 680-689.
- Jung, M.W., Larson, J., 1994. Further characteristics of long-term potentiation in piriform cortex. *Synapse* 18, 298-306.
- Kempermann, G., 2012. New neurons for 'survival of the fittest'. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 727-736.
- Kim, W.R., Sun, W., 2011. Programmed cell death during postnatal development of the rodent nervous system. *Dev. Growth Differ.* 53, 225-235.
- Klempin, F., Kronenberg, G., Cheung, G., Kettenmann, H., Kempermann, G., 2011. Properties of doublecortin-(DCX)-expressing cells in the piriform cortex compared to the neurogenic dentate gyrus of adult mice. *PLoS One* 6, e25760.
- Knoth, R., Singec, I., Ditter, M., Pantazis, G., Capetian, P., Meyer, R.P., Horvat, V., Volk, B., Kempermann, G., 2010. Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One* 5, e8809.
- Kumar, M., Grammas, P., Giacomelli, F., Wiener, J., 1996. Selective expression of c-Mas proto-oncogene in rat cerebral endothelial cells. *Neuroreport* 8, 93-96.
- Lazaroni, T.L., Raslan, A.C., Fontes, W.R., de Oliveira, M.L., Bader, M., Alenina, N., Moraes, M.F., Dos Santos, R.A., Pereira, G.S., 2012. Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 97, 113-123.
- Martin, K.A., Grant, S.G., Hockfield, S., 1992. The mas proto-oncogene is developmentally regulated in the rat central nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 68, 75-82.
- Massa, F., Koehl, M., Wiesner, T., Grosjean, N., Revest, J.M., Piazza, P.V., Abrous, D.N., Oliet, S.H., 2011. Conditional reduction of adult neurogenesis impairs bidirectional hippocampal synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6644-6649.
- Nacher, J., Crespo, C., McEwen, B.S., 2001. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur. J. Neurosci.* 14, 629-644.
- Noori, H.R., Fornal, C.A., 2011. The appropriateness of unbiased optical fractionators to assess cell proliferation in the adult hippocampus. *Front. Neurosci.* 5, 140.
- Pekcec, A., Loscher, W., Potschka, H., 2006. Neurogenesis in the adult rat piriform cortex. *Neuroreport* 17, 571-574.
- Plumpe, T., Ehninger, D., Steiner, B., Klempin, F., Jessberger, S., Brandt, M., Romer, B., Rodriguez, G.R., Kronenberg, G., Kempermann, G., 2006. Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci.* 7, 77.
- Santos, R.A., Simoes e Silva, A.C., Maric, C., Silva, D.M., Machado, R.P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S.V., Lopes, M.T., Bader, M., Mendes, E.P., Lemos, V.S., Campagnole-Santos, M.J., Schultheiss, H.P., Speth, R., Walther, T., 2003. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8258-8263.
- Sasaki, T., Kitagawa, K., Yagita, Y., Sugiura, S., Omura-Matsuoka, E., Tanaka, S., Matsushita, K., Okano, H., Tsujimoto, Y., Hori, M., 2006. Bcl2 enhances survival of newborn neurons in the normal and ischemic hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 84, 1187-1196.
- Schober, A., Peterziel, H., von Bartheld, C.S., Simon, H., Kriegstein, K., Unsicker, K., 2007. GDNF applied to the MPTP-lesioned nigrostriatal system requires TGF-beta for its neuroprotective action. *Neurobiol. Dis.* 25, 378-391.
- Seki, T., Arai, Y., 1991. Expression of highly polysialylated NCAM in the neocortex and piriform cortex of the developing and the adult rat. *Anat. Embryol. (Berl.)* 184, 395-401.
- Shapiro, L.A., Ng, K.L., Zhou, Q.Y., Ribak, C.E., 2007. Olfactory enrichment enhances the survival of newly born cortical neurons in adult mice. *Neuroreport* 18, 981-985.
- Snyder, J.S., Kee, N., Wojtowicz, J.M., 2001. Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J. Neurophysiol.* 85, 2423-2431.
- Steiner, B., Klempin, F., Wang, L., Kott, M., Kettenmann, H., Kempermann, G., 2006. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia* 54, 805-814.
- Tallant, E.A., Clark, M.A., 2003. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension* 42, 574-579.
- Tallant, E.A., Ferrario, C.M., Gallagher, P.E., 2005. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H1560-1566.
- van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., Gage, F.H., 1999. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13427-13431.
- von Bartheld, C., 2002. Counting particles in tissue sections: choices of methods and importance of calibration to minimize biases. *Histol. Histopathol.* 17, 639-648.
- von Bohlen und Halbach, O., 2005. The renin-angiotensin system in the mammalian central nervous system. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6, 355-371.
- von Bohlen und Halbach, O., 2011. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 345, 1-19.
- von Bohlen und Halbach, O., Minichiello, L., Unsicker, K., 2003. Haploinsufficiency in trkB and/or trkC neurotrophin receptors causes structural alterations in the aged hippocampus and amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2319-2325.
- von Bohlen und Halbach, O., Minichiello, L., Unsicker, K., 2005. Haploinsufficiency for trkB and trkC receptors induces cell loss and accumulation of alpha-synuclein in the substantia nigra. *FASEB. J.* 19, 1740-1742.
- von Bohlen und Halbach, O., Walther, T., Bader, M., Albrecht, D., 2000. Interaction between Mas and the angiotensin AT1 receptor in the amygdala. *J. Neurophysiol.* 83, 2012-2021.
- von Bohlen und Halbach, O., Walther, T., Bader, M., Albrecht, D., 2001. Genetic deletion of angiotensin AT2 receptor leads to increased cell numbers in different brain structures of mice. *Regul. Pept.* 99, 209-216.
- Walther, T., Balschun, D., Voigt, J.P., Fink, H., Zuschratter, W., Birchmeier, C., Ganter, D., Bader, M., 1998. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas proto-oncogene. *J. Biol. Chem.* 273, 11867-11873.
- Zhang, F., Hu, Y., Xu, Q., Ye, S., 2010. Different effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *PLoS. One* 5, e12323.
- Zhao, M., Li, D., Shimazu, K., Zhou, Y.X., Lu, B., Deng, C.X., 2007. Fibroblast growth factor receptor-1 is required for long-term potentiation, memory consolidation, and neurogenesis. *Biol. Psychiatry* 62, 381-390.