

Aus der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. med. L. Wurzinger

**Neuroanatomische Charakterisierung von Neuronen im Trigeminus-Ganglion,
die den extraoculären Augenmuskel des Primaten innervieren**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig – Maximilians – Universität zu München

Vorgelegt von
Andreas Nouriani
aus Ludwigshafen/Rhein
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. J.A. Büttner-Ennever Ph.D (London)

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Martin Grüterich
Prof. Dr. Wolfgang Müller-Felber

Mitbetreuung durch den
habilitierten Mitarbeiter: Priv. Doz. rer. nat. A. Horn-Bochtler

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Extraoculäre Augenmuskeln	1
1.2 Anatomischer Feinbau des extraoculären Augenmuskels	1
1.3 Motorische Innervation	2
1.4 Motoneurone.....	3
1.5 Sensorische Innervation	4
1.6 Nervus trigeminus und Ganglion trigeminale	5
1.7 Zielsetzung des Projekts.....	7
1.8 Methode.....	7
1.9 Fragestellungen	7
2 Material und Methoden	9
2.1 Versuchstiere.....	9
2.2 Injektion einer Tracersubstanz in den Augenmuskel	9
2.3 Perfusion.....	9
2.4 Präparation und Entnahme der Trigeminus-Ganglien.....	10
2.5 Histologische Aufbereitung	10
2.5.1 Immunoperoxidase-Nachweis der Cholera-toxin-Untereinheit B (CTB)	10
2.5.2 Enzymatischer Nachweis von WGA-HRP.....	11
2.5.3 Doppelimmunfluoreszenz zur Darstellung des Tracers und dem Marker	11
2.6 Auswertung.....	12
3 Ergebnisse	14
3.1 Beurteilung der Injektionen	14
3.2 Identifizierung Tracer positiver Neurone im Trigeminus-Ganglion	16
3.3 Größenprofil retrograd markierter Neurone im Trigeminus-Ganglion.....	17
3.3.1 Größenprofile retrograd markierter TG-Neurone nach distaler Injek- tion	19

3.3.2	Größenprofile retrograd markierter TG-Neurone nach distaler und zentraler Injektion.....	20
3.4	Immunhistochemische Charakterisierung von retrograd markierten Trigemini-neuronen.....	21
3.5	Parvalbumin-positive Neurone.....	21
3.5.1	Parvalbumin-positive Population nach Tracerinjektion in Muskelbauch und Muskel-Sehnen-Übergang	21
3.5.2	Parvalbumin-positive Population nach Tracerinjektion in die Konjunktiva.	22
3.6	Substanz P-positive Neurone	28
3.6.1	Substanz P-positive Population nach Tracerinjektion in Muskelbauch und Muskelsehnenübergang.....	28
3.6.2	SP-positive Population nach Tracerinjektion in die Konjunktiva	28
4	Diskussion.....	35
4.1	Tracerinjektionen und Tracer-Kontamination der umliegenden Strukturen.....	35
4.2	Lokalisation retrograd markierter Neurone im Trigemini-Ganglion.....	36
4.3	Zellgrößenprofil retrograd markierter TG-Neurone	37
4.4	Immunhistochemische Charakterisierung der markierten Zellen im TG ..	38
4.4.1	Parvalbumin-positive Neurone im Trigemini-Ganglion.....	38
4.4.2	Substanz P-positive Neurone im Trigemini-Ganglion	41
5	Zusammenfassung	43
	Referenzen	IX
	Anhang	XIX
	Danksagung	XXIX
	Lebenslauf.....	XXX
	Ehrenwörtliche Erklärung	XXXI

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Extraoculäre Augenmuskeln des Menschen; Sobotta 2006	1
Abb. 2: Längsschnitt Primatenaugenmuskel.....	3
Abb. 3: Lokalisation der Motoneurone der einzelnen Augenmuskeln im Nucleus oculomotorius beim Affen	4
Abb. 4: Innervationsgebiet des Trigeminus-Ganglions, Tillmann, 2005.....	6
Abb. 5: Übersicht Trigeminus-Ganglion B61.....	16
Abb. 6: Ausschnittsvergrößerung Trigeminus-Ganglion B61	17
Abb. 7: Histogramm B61; TG/CTB	19
Abb. 8: Histogramm C96014; TG/CTB	19
Abb. 9: Histogramm Y59; TG/CTB	20
Abb. 10: Histogramm ZK 04; TG/CTB	20
Abb. 11: Detailabbildungen von CTB/PV doppelmarkierten Neuronen.....	22
Abb. 12: Längsschnittserie A-D durch das TG im Fall ZK 04.....	23
Abb. 13: Längsschnittserie A-F durch das TG im Fall 32-473	25
Abb. 14: Histogramm ZK 04 distal und zentral; CTB/PV	26
Abb. 15: Histogramm ZN 10 Muskelsehne; WGA/PV	26
Abb. 16: Histogramm 32-473 Muskelbauch; WGA/PV	27
Abb. 17: Histogramm 32-473 Konjunktiva; CTB/PV	27
Abb. 18: Detailabbildungen von CTB/SP doppelmarkierten Neuronen.....	29
Abb. 19: Längsschnittserie A-D durch das TG im Fall ZK 04.....	30
Abb. 20: Längsschnittserie A-F durch das TG im Fall 32-473	32
Abb. 21: Histogramm ZK 04 Muskelbauch/Muskelsehne; CTB/SP	33
Abb. 22: Histogramm ZN 10 Muskelbauch; CTB/SP	33
Abb. 23: Histogramm 32-473 Konjunktiva; CTB/SP	34

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Detektierte retrograd markierter Neurone nach Injektion eines Tracers in den Augenmuskel oder die Konjunktiva.	15
Tab. 2: Retrograd markierte Neurone in den Motoneuronengruppen der drei Augenmuskelkerne.....	15
Tab. 3: Übersicht über die quantitative Auswertung tracer-markierter Zellen im ophthalmischen Teil des TG in vier verschiedenen Fällen.	18
Tab. 4: Übersicht über Anzahl der tracer-markierten TG-Neurone in 4 Fällen und die jeweils anteilige Populationen von PV-positiven tracer-markierten Neuronen und SP-positiven tracer-positiven Zellen	21

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	=	Abbildung
CCN	=	Nucleus centralis caudalis
ChAT	=	Cholinacetyltransferase
CTB	=	Choleratoxin Untereinheit B
DAB	=	Diaminobenzidin
Dmax	=	maximaler Durchmesser
Dmin	=	minimaler Durchmesser
HRP	=	Meerrettichperoxidase
IO	=	Musculus obliquus inferior
IR	=	Musculus rectus inferior
LP	=	Musculus levator palpebrae
LR	=	Musculus rectus lateralis
MIF	=	multipel-innervierte Fasern (multiply innervated fibers)
MR	=	Musculus rectus medialis
N V	=	Nervus trigeminus
N V1	=	Nervus ophthalmicus
N V2	=	Nervus maxillaris
N V3	=	Nervus mandibularis
nIII	=	Nucleus oculomotorius
nIV	=	Nucleus trochlearis
nV	=	Nucleus trigeminus
nVI	=	Nucleus abducens
nVII	=	Nucleus facialis
PBS	=	Phosphat - Puffer
pChAT	=	Periphere Cholinacetyltransferase
PV	=	Parvalbumin
RT	=	Raumtemperatur
SIF	=	einzel-innervierte Fasern (singly innervated fibers)
SO	=	Musculus obliquus superior
SP	=	Substanz P
SR	=	Musculus rectus superior
Tab.	=	Tabelle

TBS	=	Tris - Puffer
TG	=	Trigeminus-Ganglion
Vmes	=	Nucleus mesencephalicus n. trigemini
WGA-HRP	=	Weizenkeimagglutinin gekoppelt an Meerretichperoxidase

1 Einleitung

1.1 Extraoculäre Augenmuskeln

Das Auge wird durch die Koordination von sechs äußeren Augenmuskeln bewegt, vier gerade Muskeln: Musculus rectus superior (SR), inferior (IR), medialis (MR), lateralis (LR) und zwei schräge Augenmuskeln: Musculus obliquus superior (SO) und inferior (IO). Die Innervation des SR, IR, MR und des IO erfolgt über den Nervus oculomotorius, die Innervation des LR über den Nervus abducens, und der SO wird vom Nervus trochlearis innerviert.

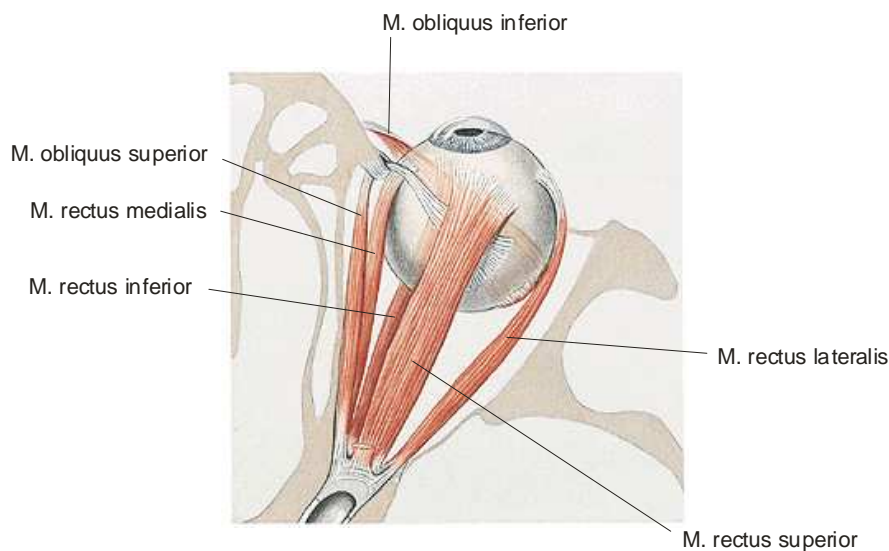


Abb. 1: Extraoculäre Augenmuskeln des Menschen; Sobotta 2006

1.2 Anatomischer Feinbau des extraoculären Augenmuskels

Typische Skelettmuskeln bestehen aus zwei grundsätzlich unterschiedlichen Muskelfasertypen, den slow-twitch Fasern und fast-twitch-Fasern. Beide Muskelfasertypen können wiederum in schnell ermüdbare und langsam ermüdbare Fasern unterteilt werden (Brooke und Kaiser, 1979; Peter et al. 1972; Gauthier und Lowey, 1979; Schaffino et al. 1989).

Die extraoculären Augenmuskeln haben dagegen einen sehr komplexen Feinbau. Neben den klassischen Muskelfasertypen des Skelettmuskels existiert ein weiterer Fasertyp, die sogenannten non-twitch Fasern, die bei Amphibien weit verbreitet sind, beim Säuger jedoch allenfalls noch im Musculus tensor tympani und der

Larynxmuskulatur auftreten (Morgan und Proske, 1984; Dieringer und Precht, 1986; Han et al., 1999).

Zusätzlich können die Augenmuskeln von Säugetieren in zwei von einander abgrenzbare Schichten unterteilt werden: eine äußere, der Orbita zugewandte Schicht („orbital layer“), die aus kleinkalibrigen Fasern besteht und eine innere, dem Bulbus zugewandte Schicht („global layer“), die aus großkalibrigen Muskelfasern aufgebaut ist (Spencer und Porter, 2006).

1.3 Motorische Innervation

In Bezug auf die motorische Innervation, können die Muskelfasern im Augenmuskel in zwei Hauptklassen eingeteilt werden: einfach innervierte Muskelfasern (SIF-singly innervated fibres) und multipel innervierte Muskelfasern (MIF–multiply-innervated fibres) (Mayr et al., 1975; Morgan und Proske, 1984; Spencer und Porter, 1988; Spencer und Porter, 2006).

Die SIFs entsprechen den twitch-Fasern der Skelettmuskulatur und reagieren auf einen elektrischen Reiz mit dem „Alles oder Nichts-Prinzip“, was zu einer schnellen Kontraktion führt. Sie werden durch relativ dicke (7-11µm) Nervenfasern innerviert, die im mittleren Drittel der Muskelfaser über nur eine motorische „en plaque“ Endplatte terminieren, von wo aus sich das Aktionspotential über die ganze Muskelfaser ausbreitet. (Namba et al. 1968; Kaczmariski, 1974)

Die MIFs entsprechen den non-twitch Fasern. Sie werden von dünnen (3-5 µm), myelinisierten Nervenfasern innerviert. Die motorische Endplatte ist in kleine, verzweigte Untereinheiten aufgeteilt, sogenannte „en grappe“ Endplatten, die sich über den gesamten Muskel verteilen. Sie ermüden nicht und antworten auf einen elektrischen Reiz, im Gegensatz zu den SIF mit einer langsamen tonischen Kontraktion, die sich nicht über den ganzen Muskel ausbreitet (Bondi und Chiarandini, 1983). Zusätzlich kann der Muskeltonus über einen längeren Zeitraum mit relativ wenig Energieaufwand gehalten werden (Lennerstrand und Nichols, 1977; Morgan und Proske, 1984; Nelson et al., 1986)

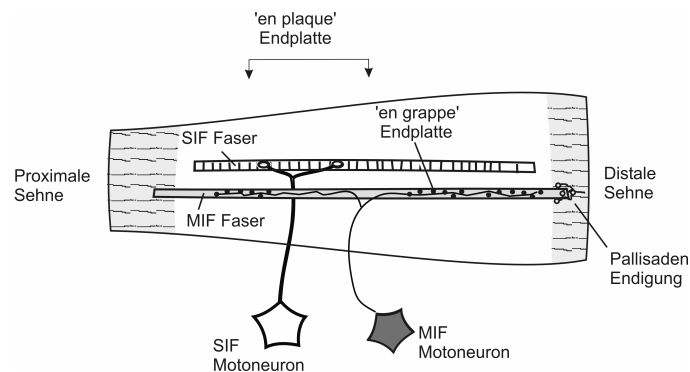


Abb. 2: Längsschnitt Primatenaugenmuskel

Der schematisierte Längsschnitt durch den Augenmuskel eines Primaten zeigt die Innervation der zwei Hauptklassen an Muskelfasern (nach Büttner-Ennever et al., 2001): Einfach innervierte Fasern (SIF) deren Motoneurone über „en plaque“ Endplatten terminieren und multipel innervierte Fasern (MIF), deren Motoneurone über „en grappe“ Endplatten terminieren. Am Übergang von Muskel zu Sehne finden sich in den multipel innervierten Fasern die so genannten Pallisaden-Endigungen, die aus einer Vielzahl an Nervenendigungen bestehen.

1.4 Motoneurone

Die Motoneurone der Augenmuskeln liegen in drei paarigen Kerngebieten im Hirnstamm, dem Nucleus oculomotorius (nIII), Nucleus trochlearis (nIV) und Nucleus abducens (nVI). Neurone des nIII innervieren den ipsilateralen M. rectus medialis, M. rectus inferior und M. obliquus inferior, sowie den kontralateralen M. rectus superior. Dabei zeigen die Motoneurone im nIII eine somatotopische Anordnung. Die Motoneurone des Musculus levator palpebrae (LP), der das Oberlid hebt, liegen in einem unpaaren abgegrenzten Kern, dem Nucleus centralis caudalis (CNN), dorsomedial zum caudalen nIII. Neurone des nIV innervieren den kontralateralen Musculus obliquus superior, Neurone des nVI innervieren den ipsilateralen Musculus rectus lateralis (Übersicht: Büttner-Ennever 2006). Kürzlich konnte beim Affen mit Trakt-Tracermethoden gezeigt werden, dass die SIF- und MIF-Motoneurone räumlich voneinander getrennt sind und ein unterschiedliches histochemisches Profil zeigen (Büttner-Ennever und Akert, 1981; Büttner-Ennever et al., 2001; Eberhorn et al., 2005a; Büttner-Ennever, 2006).

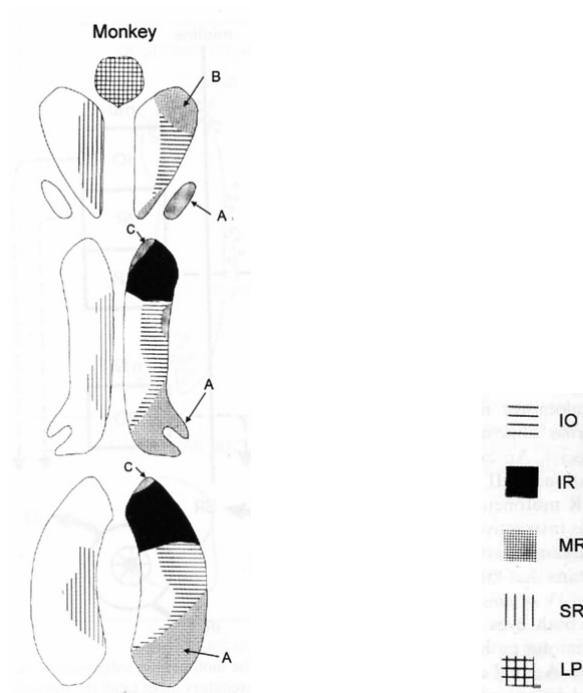


Abb. 3: Lokalisation der Motoneurone der einzelnen Augenmuskeln im Nucleus oculomotorius beim Affen (nach Büttner-Ennever et al., 2006)

1.5 Sensorische Innervation

In der Literatur findet sich kein klarer Konsens darüber, welche propriozeptiven Informationen aus dem Augenmuskel stammen und vor allem über welche Strukturen sie vermittelt werden, insbesondere bei einer großen Variationsbreite an Propriozeptoren innerhalb der einzelnen Spezies (Ruskell, 1999; Donaldson, 2000). Propriozeptive Rezeptoren in Form von Muskelspindeln finden sich in den meisten Skelettmuskeln, wobei sie im Augenmuskel nur in einigen Spezies nachgewiesen wurden. Während in den, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Augenmuskeln aus Makaken ebenso wie in Hunden, Katzen, Ratten und Meerschweinchen keine Muskelspindeln existieren, finden sie sich in Augenmuskeln von Menschen, Giraffen, Schweinen und allen Huftieren (Maier et al., 1974; Ruskell, 1999; Donaldson, 2000; Büttner-Ennever et al., 2003).

Eine andere, in Skelettmuskeln auftretende Form von Propriozeptoren sind Golgi-Sehnenorgane. Im Augenmuskel hingegen konnten Golgi-Sehnenorgane bislang nur in einigen Paarhufern, wie in Schafen, Kamelen, Schweinen oder Kälbern nachgewiesen werden (Ruskell, 1990; Blumer et al., 2003), und nur vereinzelt auch im Rhesusaffen (Ruskell, 1979).

Eine bislang nur im extraoculären Augenmuskel gefundene Struktur sind die Palisadenendigungen oder „myotendinous cylinders“ (Dogiel, 1906; Ruskell, 1978; Alvarado-Mallart und Pincon Raymond, 1979; Richmond et al., 1984; Ruskell, 1999; Lukas et al., 2000) (Abb.2). Sie befinden sich an der äußersten distalen Spitze des Muskels, in der Übergangszone von Muskel zu Sehngewebe, ausschließlich in der globalen Schicht der MIFs und bilden eine Art Kappe aus einer Vielzahl von Nerven terminalen. Sie wurden in allen bisher untersuchten Spezies gefunden (Eberhorn et al. 2005; Büttner-Ennever et al. 2006). Trotz des anatomischen Detailwissens über die extraoculäre Muskulatur wird ihre Funktion noch kontrovers diskutiert. Es gibt eine Reihe verschiedener Untersuchungen, die eine motorische Eigenschaft (Sas und Schab, 1952; Shall et al., 1995; Lukas et al., 2000; Blumer et al., 2001; Konakci et al., 2005a) postulieren. Andere Gruppen befürworten eine sensorische oder eine sowohl sensorische als auch motorische Funktion (Lukas et al., 2000). Möglicherweise sind die Palisadenendigungen die einzige in allen bisher untersuchten Spezies vorhandene Struktur, die propriozeptive Signale vom Augenmuskel übermittelt.

1.6 Nervus trigeminus und Ganglion trigeminale

Der Nervus trigeminus versorgt als gemischt sensibel und motorischer Hirnnerv mit seinem größeren sensorischen Anteil die Haut des Gesichts, Mund-, Nasenschleimhaut und die Augenhöhle. Er tritt seitlich aus der Pons aus und zieht nach vorne in Richtung Orbita über die Felsenbeinpyramide, wo er unter der Dura mater verschwindet. Dabei bildet er in einer großen Duratasche ein großes sensibles Ganglion, das Ganglion trigeminale.

Das Trigemini-Ganglion (TG) ist ein sichelförmiger etwa ein bis eineinhalb Zentimeter langer Körper, der im Bereich der Spitze der Felsenbeinpyramide über der Arteria carotis interna liegt. Das Ganglion selbst beherbergt pseudounipolare Zellen und entspricht in Bau und Funktion einem Spinalganglion. Seine Zellen sind entsprechend den drei Hauptästen des Nerven in eine ophthalmische (N V1), maxilläre (N V2) und mandibuläre (N V3) Abteilung gegliedert. Der kaudale (V3) Ast versorgt den Unterkiefer inklusive der Unterlippe, der mediale (V2) Ast den Bereich zwischen Oberlippe und Unterlid. Der ophthalmische Ast versorgt sensibel neben der Augenhöhle und dem Bulbus inklusive Sklera und Cornea die Tränendrüse, indem sich parasymphatische postganglionäre Fasern aus dem Ganglion pterygopalatinum

dem N. lacrimalis anlegen, die die Glandula lacrimalis innervieren (Leonhardt, H; B. Tillmann, K. Zilles, 1988).

Im Bezug auf den Augenmuskel konnten verschiedene Untersuchungen zeigen, das Meerrettich-peroxidase (HRP), als eine in die Augenmuskeln injizierte Tracer-substanz über retrograden axonalen Transport nicht nur in die Motoneurone der dazugehörigen Hirnnervenkerne transportiert wurde, sondern auch eine signifikante Anzahl pseudounipolarer Zellen im ipsilateralen TG den Tracer aufgenommen hatte (Porter und Spencer, 1982; Porter et al., 1983; Daunicht et al., 1985; Porter und Donaldson, 1991). Neben den pseudounipolaren Somata im Trigemini-Ganglion finden sich zusätzliche sensorische pseudounipolare Zellen im Nucleus mesencephalicus n. trigemini (Vmes) im Hirnstamm (Ramon y Cajal 1896, 1909; Scharf, 1956; Brodal, 1981; Usnoff et al., 1997; Marani und Usunoff, 1998; Lazarov, 2000). Der Vmes enthält hauptsächlich propriozeptive Neurone, die die Kaumuskulatur innervieren (Capra et al. 1985, Shigenaga et al., 1988; Lazarov, 2002), könnte aber ebenfalls propriozeptive Information aus den Augenmuskeln erhalten, da nach Tracerinjektionen in den Augenmuskel in einigen Versuchen retrograd markierte Neurone im Vmes detektiert wurden (Bortolami et al., 1987; Buisseret-Delmas und Buisseret, 1990).

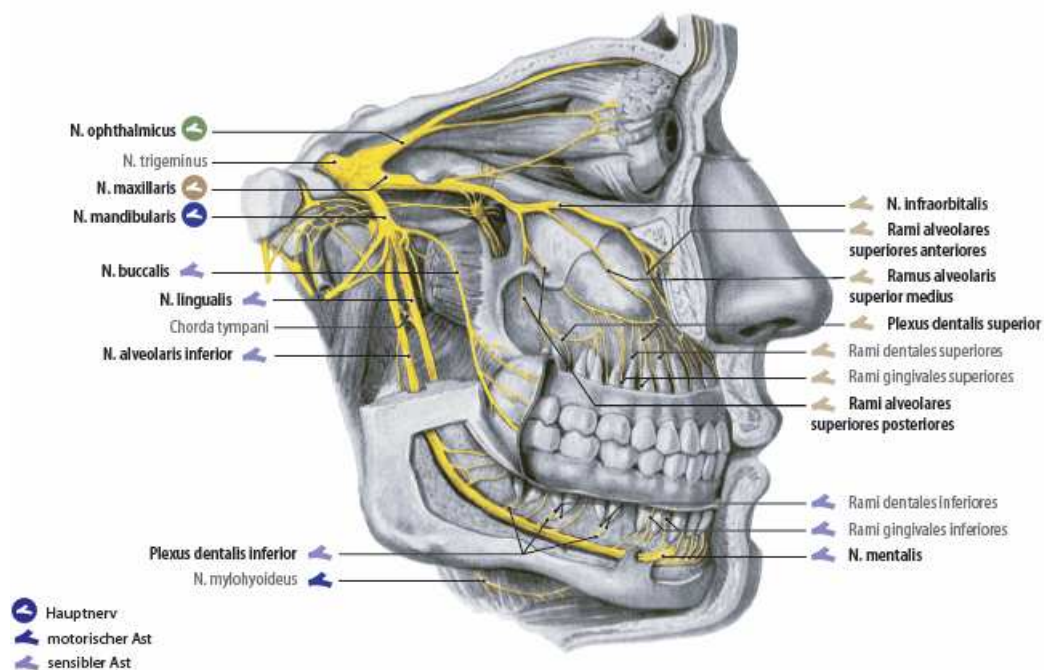


Abb. 4: Innervationsgebiet des Trigemini-Ganglions, Tillmann, 2005

1.7 Zielsetzung des Projekts

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine systematische Untersuchung der histochemischen Eigenschaften der Neurone im Trigeminus-Ganglion (TG) beim Rhesusaffen, welche die Augenmuskeln innervieren. Dazu wurden die Somata der TG-Neurone über eine Tracerinjektion in den äußeren Augenmuskel dargestellt und mit Hilfe von Immundoppelfärbungen auf die Marker Parvalbumin und Substanz P untersucht. Das Calcium-bindende Protein Parvalbumin wurde in den Spinalganglien in den Somata propriozeptiver Afferenzen gefunden (Ichikawa et. al., 1994), während Substanz P als Marker für Schmerzrezeptoren beschrieben wird (Hunt und Rossi, 1985, Levine et al., 1993). Damit werden in der vorliegenden Arbeit erstmals histochemische Eigenschaften von afferenten TG-Neuronen beschrieben, die zum Augenmuskel projizieren, und Rückschlüsse auf Funktionen zulassen.

1.8 Methode

Retrogrades Tracing erfolgt durch Proteine, wie zum Beispiel an Weizenkeimagglutinin gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (WGA-HRP), oder durch Toxine, wie beispielweise der ungiftigen Untereinheit B des Cholera-toxins, die in einen Augenmuskel injiziert werden. Dort werden die Tracersubstanzen unter anderem in die freien Nervenendigungen aufgenommen und in retrograder Richtung innerhalb des Axons transportiert. Zentral wird die Tracersubstanz in den Zellkörpern der Nervenzellen abgelagert und mit sensitiven histochemischen Methoden durch Antigen-Antikörperreaktionen nachgewiesen (Sawchenko und Gerfen, 1985; Büttner-Ennever et al., 1988; Köbbert et al., 2000). Nähere Untersuchungen der Tracer-positiven Neurone sind über Fluoreszenz-Doppelfärbungen möglich, bei denen jeweils ein zusätzliches Antigen in einer Zelle nachgewiesen werden kann.

Somit können Tracer-positive Neurone im TG detektiert werden und gleichzeitig können zelleigene Proteine oder Enzyme in den Tracer-positiven Zellen nachgewiesen werden.

1.9 Fragestellungen

Ausgangspunkt des Projekts war die Beobachtung, dass eine Tracerinjektion in den extraoculären Augenmuskel zu einer retrograden Markierung von Neuronen im

ipsilateralen TG führte (Porter und Spencer, 1982; Büttner-Ennever et al., 1988). Da es neben dieser Beobachtung bislang keine systematischen Untersuchungen zur Morphologie und Funktion dieser Neurone gibt, geht die vorgelegte Arbeit im Weiteren auf folgende Fragen ein:

1. Welche Neurone innerhalb des Trigeminus-Ganglions repräsentieren die sensiblen Afferenzen aus dem extraoculären Muskel?
2. Stammen die im TG durch retrograd markierte Neurone repräsentierten sensiblen Afferenzen aus dem Augenmuskel, oder kann eine versuchsbedingte Tracerkontamination der Konjunktiva eine ähnliche Markierung an Neuronen im TG hervorrufen?
3. Weisen die im TG gefundenen retrograd markierten Neurone reproduzierbare morphologische und cytochemische Charakteristika auf?
4. Können die im TG gefundenen retrograd markierten Neurone durch die gewählten Antigene Parvalbumin (PV) und Substanz P (SP) in verschiedene Subpopulationen eingeteilt werden, die Rückschlüsse auf die Funktion der Nervenendigungen im Augenmuskel erlauben?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Experimente erfolgten an 6 Rhesusaffen im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Prof. Cohen und Dr. Yakushin (Mt. Sinai Hospital New York), und mit Prof. Hess (Universitätsspital Zürich). In allen Fällen wurden die staatlichen und universitären Regularien zur Einhaltung des Tierschutzes erfüllt (NIH Publication 85-23, Revised 1985). Die Versuche wurden an männlichen Tieren der Gattung *Macaca mulatta* durchgeführt (Alter zwischen 5-7 Jahre; Gewicht zwischen 9-11 kg). Die operativen Eingriffe wurden von dem Betreuer gemeinsam mit den Projektleitern in New York bzw. Zürich durchgeführt.

2.2 Injektion einer Tracersubstanz in den Augenmuskel

Für die Versuche wurden die Tiere initial mit Ketavet (0,15ml/kg Körpergewicht) i.m. betäubt. Mit Pentobarbital (30mg/kg Körpergewicht) i.v. erfolgte die Anaesthesie. Unter sterilen Bedingungen wurden nach einer Schnittinzision der Konjunktiva der Musculus rectus lateralis (LR), der Musculus rectus superior (SR) oder der Musculus rectus medialis (MR) freigelegt. Mit Hilfe einer Hamilton-Spritze wurden zwischen 1-10µl der ungiftigen Untereinheit B des Choleratoxins (CTB; 1% in aqua bidest) oder Weizenkeim-Agglutinin gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase (WGA-HRP; 5% in Ringer-Lösung) in verschiedene Bereiche eines Augenmuskels injiziert: CTB in den Muskelbauch und den Muskel-Sehnenübergang im Fall ZK 04, CTB in den Muskel-Sehnenübergang bei B 61, C 96014 und Y59, und WGA-HRP in den Muskelbauch bei Fälle 32-473 und ZN10. Eine Tracerinjektion mit CTB in die Konjunktiva im Fall 32-473 diente als Kontrolle (siehe Tabelle 1).

2.3 Perfusion

Nach einer Überlebenszeit von drei Tagen wurden die Tiere mit einer Überdosis Nembutal eingeschlafert. Direkt nach Atemstillstand wurde der Thorax eröffnet und folgende Lösungen über die linke Herzkammer perfundiert: Vorspülung mit 0.9% NaCl bei 37°C und Fixierung mit 2-3l 4% Paraformald ehyd in 0.1 M Phosphatpuffer (PH 7.4) bei 4°C.

2.4 Präparation und Entnahme der Trigeminalganglien

Nach der Perfusion wurde die Schädelkalotte eröffnet und das Gehirn entnommen. Durch stumpfes Abpräparieren der kompletten Dura mater in der vorderen und mittleren Schädelgrube erlangte man Sicht auf das, in periganglionäres Bindegewebe eingebettete TG. Die Durchtrennung der knöchernen Ala minoria des Os sphenoidale und die Entfernung der Sella turcica erleichterten den Zugang zur Fissura orbitalis superior.

Nach dem Abpräparieren des Bindegewebes konnten die Nv. V1 in ihrem Verlauf bis zum Durchtritt durch die Fissura orbitalis superior verfolgt und dargestellt werden. Ebenso wurden die Nv. V2 und die Nv V3 bis zu ihren Eintrittsstellen durch das Foramen ovale und Foramen rotundum zur Darstellung gebracht. Die Mobilisation des gesamten TG erfolgte von der kaudal gelegenen Radix motoria nach rostral durch stumpfes Abpräparieren unter Mitnahme des Bindegewebes. Nach der Mobilisierung konnten die Nv. V1, V2, V3 an Ihren Eintrittsstellen durch Ihre Foramina, beziehungsweise der Fissura mit dem Skalpell durchtrennt werden. Die stumpfe Entfernung des periganglionären Bindegewebes erfolgte vor Einlagerung der Ganglien in aufsteigende Konzentrationen in einer Sucrose-Lösung (10%, 20%, 30% Sucrose in 0.1 M PBS, pH 7,4 bei 4°C) zur Verhinderung von Gefrierartefakten beim anschließenden Gefrierschneiden.

2.5 Histologische Aufbereitung

Die entnommenen Trigeminalganglien wurden bei -55°C in Tissue Tek eingebettet, in Serie von medial nach lateral am Kryostat geschnitten und als 20µm dicke Schnitte direkt auf einem Objektträger aufgenommen. Anschließend wurden die Schnitte bei 4°C für 7 Tage gelagert, bevor die histochemischen und immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis auf den Tracer CTB und WGA-HRP, sowie auf die Marker Substanz P und Parvalbumin, erfolgten.

2.5.1 Immunoperoxidase-Nachweis der Cholera-toxin-Untereinheit B (CTB)

Als histologische Übersichtspräparate für den Nachweis CTB positiver Zellen und zur Eingrenzung ihrer Lokalisation innerhalb des Ganglions wurden von jedem achten Schnitt Immunoperoxidase-Färbungen mit Diaminobenzidin (DAB) angefertigt. Hierzu wurden die Schnitte mit einer 3% Wasserstoffperoxid + Methanol + PBS pH 7.4 zur

Blockierung der endogenen Peroxidasen 10 Minuten vorbehandelt. Jedem Arbeitsschritt folgten, wenn nicht anders angegeben, je drei Zwischenwaschungen mit PBS pH 7.4 von je 10 Minuten. Einer Präinkubation mit 5% Normal-Kaninchenserum (NRS, Vector) + 0.3% Triton in 0.1M PBS pH 7.4 von einer Stunde folgte eine Inkubation der Schnitte mit einem Ziege anti-CTB Antikörper (Verdünnung 1:20000, List Biological Laboratories 703) für einen Tag bei 20°C. Als Zweitantikörper wurde mit einem biotinierten anti-Ziege Antikörper (Verdünnung 1:200, Vector) für eine Stunde inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte eine einstündige Inkubation mit Extravidin-Peroxidase (EPA 1:1000). Mit einer Reaktion in 0.05% Diaminobenzidin (DAB) und 0.01% Wasserstoffperoxid in 0.05M TBS pH 8 erfolgte die abschließende Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes. Nach dem Trocknen, wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entfettet und entwässert, bevor Sie mit Depex unter Deckgläschen eingedeckelt wurden.

2.5.2 Enzymatischer Nachweis von WGA-HRP

Der Tracer WGA-HRP wurde enzymatisch mit Tetramethylbenzidin (TMB) in den Schnitten nachgewiesen. Dabei wurden die Schnitte in eiskaltem PBS (0,1M, pH 7,4) aufgefangen, in einem Gemisch aus ethanolischer TMB-Lösung und acetatgepufferter Natriumferroprussiat-Lösung (pH 3,3) präinkubiert und nach anschließender Zugabe einer Mischung aus β -D-Glucose, Ammoniumchlorid und Glucoseoxidase weiter inkubiert. Nach der Stabilisierung der Schnitte mit Ammoniumheptamolybdat erfolgte die Gegenfärbung mit Neutralrot. Da das Reaktionsprodukt labil gegenüber Alkohol ist, erfolgten alle Färbeschritte in 4°C gekühlten Lösungen. Nach Aufziehen auf gelatinisierte Objektträger, Trocknen (4°C) und Entfetten in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol wurden die Schnitte durch Rückführung in einer Alkoholreihe mit absteigender Konzentration rehydriert, in Neutralrot gefärbt, in Alkohol differenziert und nach vollständiger Entwässerung in Xylol mit DPX eingedeckelt. Die Schnitte wurden im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

2.5.3 Doppelimmunfluoreszenz zur Darstellung des Tracers und dem Marker

Zur immunhistochemischen Charakterisierung der tracer-markierten TG-Neurone wurden nachfolgend aufgeführte Färbungen durchgeführt: kombinierte Immunfluores-

zenz oder enzymatische Nachweismethoden zur Identifikation von CTB oder WGA-HRP mit zusätzlicher Doppelmarkierung für 1. SP, 2. PAV.

Zuerst erfolgte die Inkubation mit 5% Normal-Esel-serum + 0.3% Triton in 0.1M PBS pH 7.4 für eine Stunde bei Raumtemperatur. Jedem Arbeitsschritt folgten, wenn nicht anders angegeben, jeweils drei Zwischenwaschungen mit PBS pH 7.4 für je 10 Minuten. Es folgte die Inkubation mit einem Gemisch folgender Primärantikörper, die bei beiden Doppelmarkierungen ein Ziege anti-Choleraagenoid (Verdünnung 1:10000, List Biological Laboratories Inc.) oder Ziege anti-WGA (Verdünnung 1: 250; Axxora, AS2024) und jeweils einen zweiten Primärantikörper enthielten. Für den im Cocktail enthaltenen zweiten Primärantikörper wurde verwendet: Kaninchen-anti-SP (Verdünnung 1:100, Swant) und Maus-anti-PV (Verdünnung 1:1000, Swant). Die Inkubationsdauer betrug zwei Tage in Dunkelheit bei 4°C. Ein Sekundär-Antikörpercocktail folgte, der sich jeweils zusammensetzte aus: Einem Alexa-488 konjugierten anti-Ziege Antikörper (Verdünnung 1:200) zum Nachweis der CTB- oder WGA-HRP-markierten Neurone (leuchtet unter Fluoreszenz-Beleuchtung grün) und einem zweiten Sekundärantikörper, entweder Cy³-konjugiertem anti-Kaninchen (Verdünnung 1:200, zur Visualisierung SP positiver Zellen), oder einem Cy³-konjugierten anti-Maus (Verdünnung 1:200, zur Visualisierung PV positiver Zellen leuchtet rot). Nach dreimaligem Waschen der Schnitte in aqua dest. wurden die Schnitte mit Deckgläsern versehen und bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt.

2.6 Auswertung

Die Analyse der Gefrierschnitte erfolgte mit einem Lichtmikroskop, das auch eine Fluoreszenzeinrichtung enthält (Leica DMRB, Bensheim). Für die photographische Dokumentation und für die morphometrische Analyse wurden Bilder der CTB/DAB- und Nissl-gefärbten Schnitte, sowie der Immunfluoreszenzschnitte über eine auf dem Mikroskop aufmontierten Videokamera (Hamamatsu 3 CCD Video-Kamera C5810) in einen Computer eingelesen und digitalisiert. Die Bilder wurden mit Hilfe einer Bildbearbeitungs-Software (Adobe Photoshop, Version 7.0) in Kontrast und Helligkeit so lange nachbearbeitet, bis sie dem mikroskopischen Bild entsprachen. Übersichtsbilder wurden aus Detailaufnahmen mit der Bildbearbeitungssoftware zusammengesetzt. Mit dem Programm Corel Draw (Version 8.0) wurde eine Maske über die Übersichtsbilder gelegt, mit der Zellen geplottet und markiert werden können.

Hierdurch konnte jede Zelle in einem Übersichtsbild topographisch zugeordnet werden. Die morphometrische Analyse erfolgte mit Hilfe eines Bildanalyse-Programms (Optimas, Version 6,1 oder Image J). Dazu wurden für eine Größensmessung die ganglionären Zellkörper in Fokusebene der Zellkerne mit dem Curser manuell umfahren und die erhobenen Daten in eine Exeldatei exportiert. Folgende Parameter wurden erfaßt: größter Durchmesser (Dmax), kleinster Durchmesser (Dmin) und Fläche. Die Daten wurden als mittlerer Durchmesser $[Dmin+Dmax]/ 2$, in einer Excel-Datei errechnet und in Grafiken umgewandelt.

3 Ergebnisse

3.1 Beurteilung der Injektionen

Zur Beurteilung der Tracerinjektionen in die Augenmuskeln und in die Konjunktiva wurden Hirnstammschnitte mit den Augenmuskelkernen nIII, nIV und nVI ebenfalls auf die jeweils verwendeten Tracer reagiert und analysiert. Dabei wurden die untersuchten Fälle auch in Hinblick auf eine mögliche Kontamination anderer in der Orbita liegenden Strukturen untersucht (Tab.1). Dabei zeigte sich, dass bei fast allen Fällen nicht nur die Motoneurone der injizierten Augenmuskeln retrograd markiert waren, sondern auch leichtgradig die der benachbarten Muskeln. Eine Übersicht in Tabelle 1 zeigt für jeden Fall, welche Neurone jeweils nach einer Tracerinjektion tatsächlich markiert waren. Darüberhinaus wurde an Hand der bekannten Lokalisation von MIF- und SIF-Motoneuronen im nIII eine Aussage darüber getroffen, inwieweit jeweils MIF- oder SIF-Motoneurone mit Tracer markiert waren (Tabelle 2) (Büttner-Ennever et al., 2001). Das wiederum ließ Rückschlüsse auf den Ort der Traceraufnahme zu, ob vom Muskelbauch oder dem Muskelsehnenübergang.

So fanden sich z.B. im Fall ZK 04 nach Tracerinjektion in den LR neben den markierten Motoneuronen im Ncl. abducens (nVI) auch Neurone zwischen den beiden nIII in der S-Gruppe, die IO-MIF-Motoneurone enthält (Büttner-Ennever et al., 2001). Dieser Befund weist darauf hin, dass der Tracer im Fall des LR von den Endplatten des Muskelbauches aufgenommen worden war, im Fall des IO vom Muskelsehnenübergang, der in direkter anatomischer Beziehung unter dem LR liegt (siehe Abb.1). Zudem konnten Neurone im ipsilateralen Ncl. facialis (nVII) und ein Neuron im mesencephalen Trigeminskern (Vmes) detektiert werden.

Im Fall 32-473 wurden nach CTB-Injektion in die Konjunktiva IO-Motoneurone im nIII identifiziert. Nach WGA-Injektion in den Muskelbauch des MR am anderen Auge konnten neben markierten Motoneuronen des MR und des SR innerhalb nIII, Motoneurone des SO im nIV, und Motoneurone des M. levator palpebrae (LP) im centralen caudalen Kern des nIII. identifiziert werden.

In allen untersuchten Fällen zeigten sich retrograd markierte Neurone in der ophthalmischen Abteilung des ipsilateralen Trigeminus-Ganglions.

Mithilfe der Analyse über die markierten Motoneurone zeigte sich, dass bei den Fällen B61, C96014, Y59 und ZN10 der Traceruptake nur vom Muskelsehnenübergang erfolgt war, bei allen anderen Fällen vom gesamten Muskel.

Fall	Tracer	Injektionsstelle	n III	n IV	n VI	TG	V mes	n VII
B 61	CTB	MR-re. distal	+	-	-	++	-	-
C 96014	CTB	MR-re. distal	-	-	-	+++	-	-
Y 59	CTB	LR-re. distal u. intermediär	-	-	+++	+++	-	-
32-473	WGA	MR-re. zentral	++	+	+	+++	-	-
32-473	CTB	Konjunktiva re.	+	-	+	+++	-	-
ZK 04	CTB	LR-re. distal u. central	+	-	+++	+++	+	++
ZN 10	WGA	IO-li. zentral	+	-	-	+++		-

Tab. 1: Detektierte retrograd markierter Neurone nach Injektion eines Tracers in den Augenmuskel oder die Konjunktiva. + = positiv, - = negativ

Fall	n III		n IV		n VI		n CCN
	MIF	SIF	MIF	SIF	MIF	SIF	
B 61	+	-	-	-	-	-	-
C 96014	-	-	-	-	-	-	-
Y 59	-	-	-	-	+	+	-
32-473 WGA	+	+	+		-	-	+
32-473 CTB	+	+	-	-	+	+	+
ZK 04	+	+	-	-	+	+	+
ZN 10	+	+	-	-	-	-	+

Tab. 2: Retrograd markierte Neurone in den Motoneuronengruppen der drei Augenmuskelkerne

3.2 Identifizierung Tracer positiver Neurone im Trigemini-Ganglion

In allen untersuchten Fällen wurden retrograd markierte Neurone im ipsilateralen Trigemini-Ganglion (TG) gefunden, mit nahezu allen Neuronen im ophthalmischen Teil. Nur vereinzelt lagen markierte Neurone auch im maxillären Bereich (Abb.5). Unabhängig vom injizierten Augenmuskel und des Injektionsorts innerhalb des Muskels, zeigte sich ein ähnliches Verteilungsmuster innerhalb des ophthalmischen Teils. Damit ließ sich keine klare somatotopische Organisation der markierten Neurone erkennen.

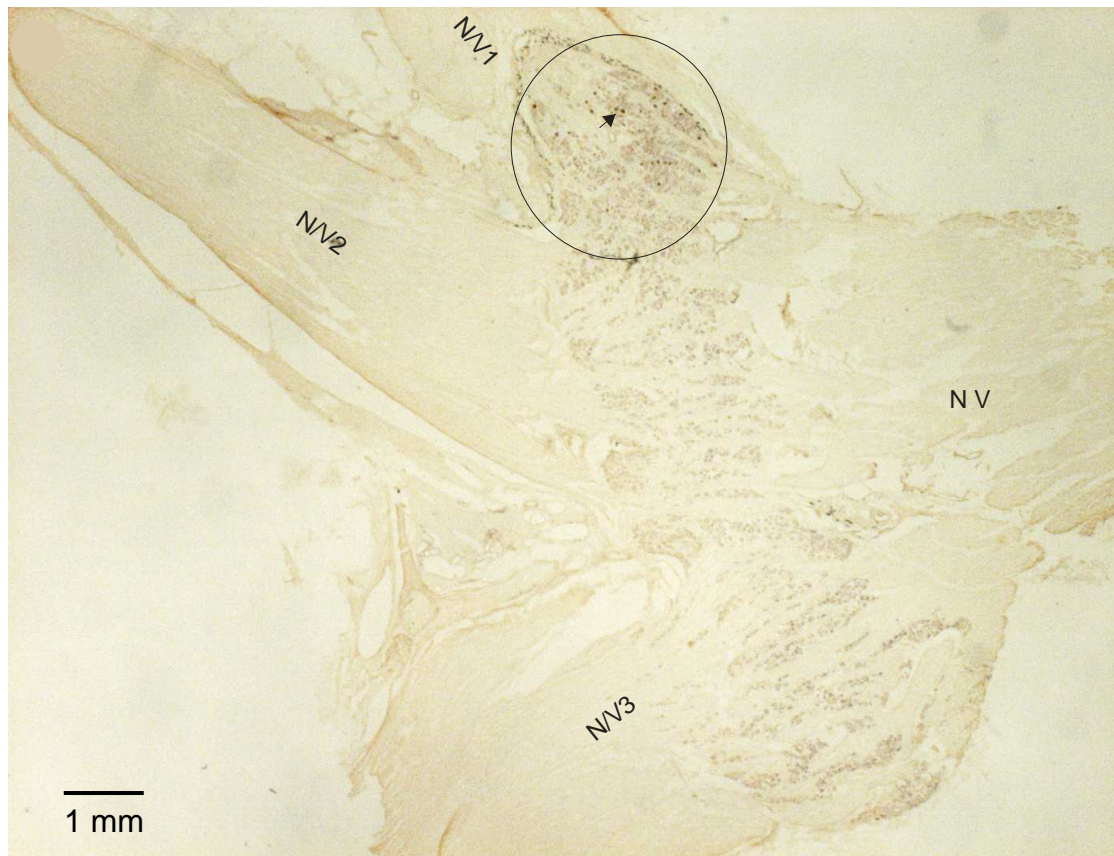


Abb. 5: Übersicht Trigemini-Ganglion (B61)

Übersichtsaufnahme eines Schnitts durch das Trigemini-Ganglion mit retrograd CTB-markierten Neuronen in der ophthalmischen Abteilung (Kreis, Pfeil). N V: Nervus trigeminus, N V/1: Nervus ophthalmicus; N V/2: Nervus mandibularis; N V/3: Nervus maxillaris.

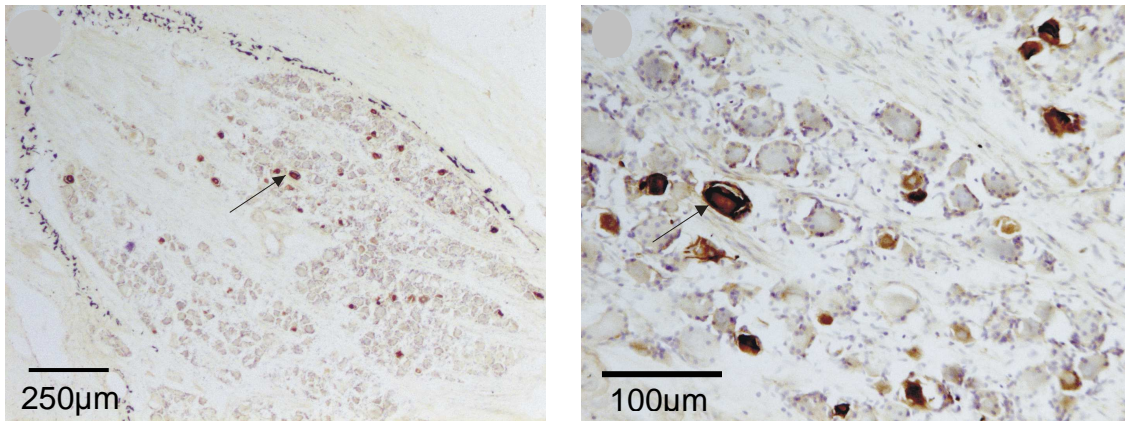


Abb. 6: Ausschnittsvergrößerung Trigemini-Ganglion B61

Ausschnittsvergrößerungen aus Abb. 5 zeigen retrograd CTB-markierte pseudounipolare Neurone (Pfeil) tief braun in der ophthalmischen Abteilung des TG.

3.3 Größenprofil retrograd markierter Neurone im Trigemini-Ganglion

Zur Darstellung eines Größenprofils der Tracer positiven Neurone im Bezug auf die gesamte Zellpopulation im TG dienten jeweils zwei repräsentative zusätzlich Nissl-gefärbte Schnitte aus der Zone des Ganglions, in der die zahlreichsten markierten Neurone zu finden waren. Das Zellgrößenprofil der Gesamtpopulation wurde über die Messung der Nissl-gefärbten TG-Neurone erstellt. Eine Übersicht zur Anzahl tracer-markierter Neurone im TG und deren prozentualen Anteil an der Gesamtpopulation im ophthalmischen Teil des TG wird in Tabelle 3 gezeigt.

Der prozentuale Anteil retrograd markierter Zellkörper im TG variierte stark, unabhängig von der Injektionsstelle. So wurden nach einer distalen Augenmuskelinjektion 6% (B61) beziehungsweise 13% (C96014) der Gesamtpopulation innerhalb des ophthalmischen Teils markiert, nach einer intermediären Injektion 35% (Y59) und Muskelbauchinjektion 9.9% (ZK04). Die genauen Daten sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Überraschenderweise fand sich im Fall C 96014 eine konsistente Population an tracer-markierten Neuronen im TG, obwohl keine Motoneurone der Augenmuskeln markiert waren. Auch Y 59 zeigte eine vergleichsweise große Population retrograd markierter TG-Neurone, obwohl im Vergleich zu den übrigen Fällen Motoneurone nur eines Augenmuskels markiert waren (Vgl. Tab. 2 und Tab. 3).

Anhand von Nissl-gefärbten Schnitten konnte die Gesamtpopulation des TG in eine Population mit kleinen Neuronen (Mittelwert: 36,561µm Durchmesser; SD: 6,197; N=236 im Fall B61 beziehungsweise Mittelwert: 34,465 µm Durchmesser; SD: 6,758; N=391 im Fall ZK 04), und eine zweite Population mit großen Zellen (Mittelwert: 56,580 µm Durchmesser; SD: 3,462; N=53 im Fall B61 beziehungsweise Mittelwert: 57,516 µm Durchmesser; SD 5,197; N=30 im Fall ZK 04) eingeteilt werden.

Das Zellgrößenprofil der tracer-markierten TG-Neurone zeigte keine Unterschiede in Hinsicht auf den Ort der Traceraufnahme, vom Muskelsehnenübergang oder vom gesamten Augenmuskel (vergleiche Abb. 7 und 8 mit Abb. 9 und 10). In allen untersuchten Fällen repräsentierten die tracer-markierten Neurone in ihrem Größenprofil die Gesamtpopulation im TG, bestehend aus einer großen kleinzelligen und einer kleineren mittel- und großzelligen Population. (Abb. 7-10).

Fall	Injektionsstelle	Anzahl Nissl stained Neurone im TG	n CTB+	CTB%
B 61	MR-re. distal	289	18	6,20
C 96014	MR-re. distal	114	15	13,16
Y 59	LR-re. distal u. intermediär	318	114	35,85
ZK 04	LR-re. distal u. central	421	42	9,90

Tab. 3: Übersicht über die quantitative Auswertung tracer-markierter Zellen im ophthalmischen Teil des TG in vier verschiedenen Fällen.

3.3.1 Größenprofile retrograd markierter TG-Neurone nach distaler Injektion

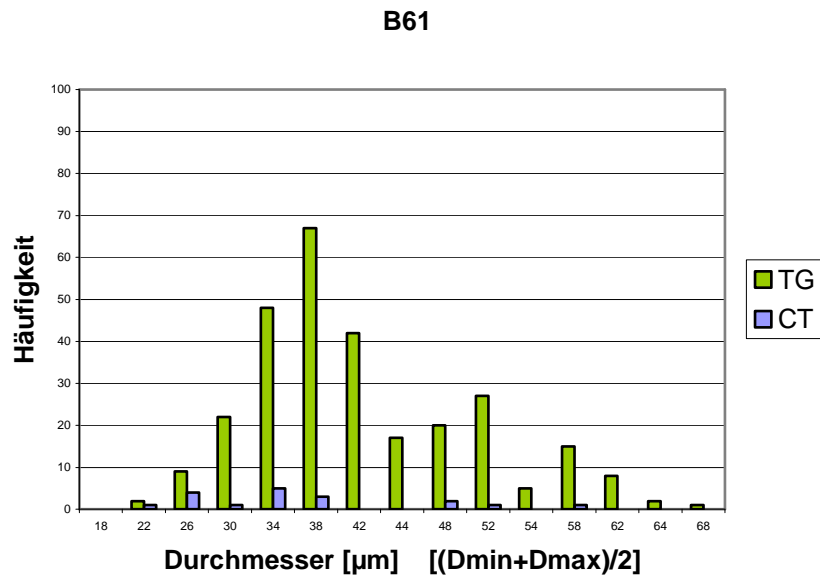


Abb. 7: Histogramm B61; TG/CTB

Häufigkeitsverteilung der mittleren Durchmesser der gesamten Neuronenpopulation im TG (grün) und der retrograd markierten Neurone (blau) nach distaler Injektion des Tracers (CTB) in die Muskelsehne.

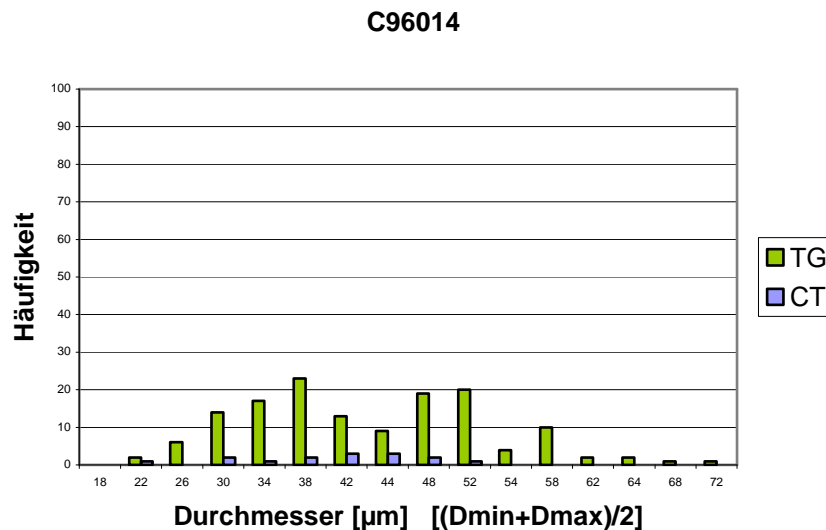


Abb. 8: Histogramm C96014; TG/CTB

Häufigkeitsverteilung der mittleren Durchmesser der gesamten Neuronenpopulation im TG (grün) und der retrograd markierten Neurone (blau) nach Injektion des Tracers distal in die Muskelsehne.

3.3.2 Größenprofile retrograd markierter TG-Neurone nach distaler und zentraler Injektion

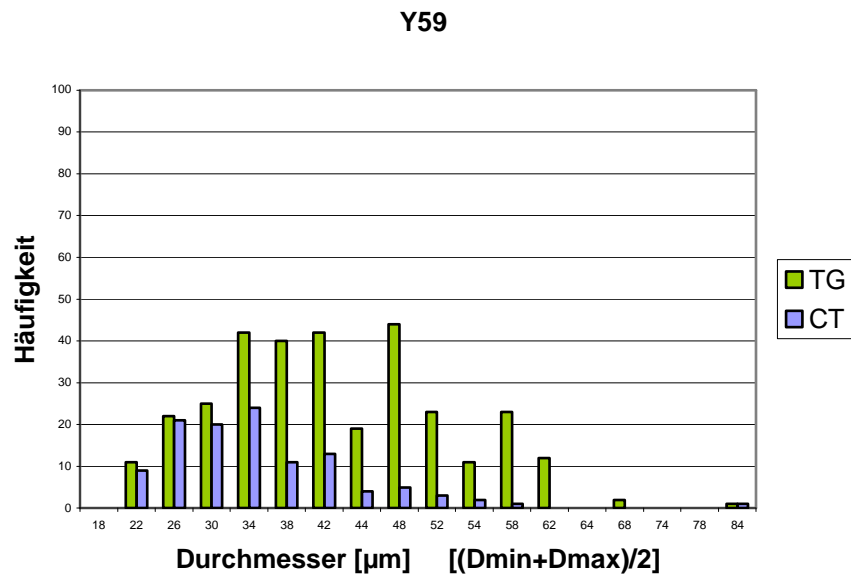


Abb. 9: Histogramm Y59; TG/CTB

Häufigkeitsverteilung der mittleren Durchmesser der gesamten Neuronenpopulation im TG (grün) und der retrograd markierten Neurone (blau) nach Injektion des Tracers in die distale (intermediäre) Muskel und den Muskel-Sehnenübergang.

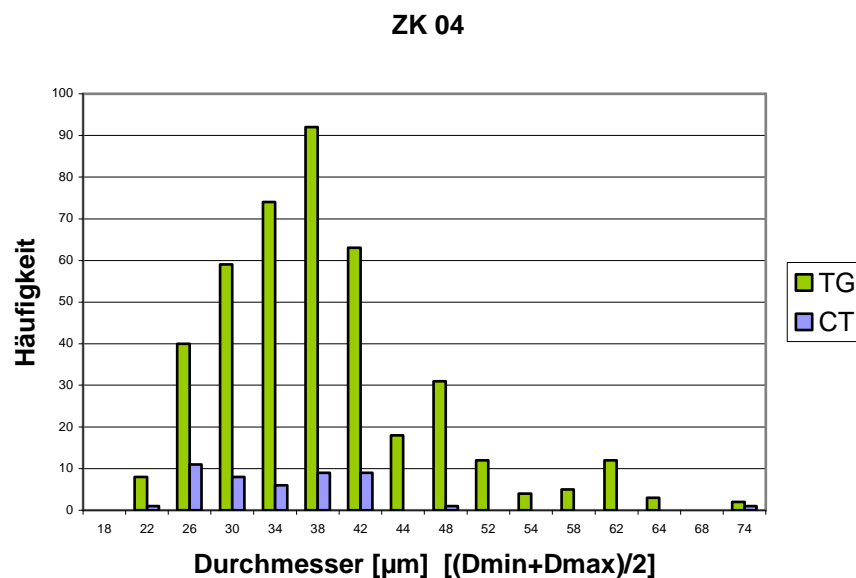


Abb. 10: Histogramm ZK 04; TG/CTB

Häufigkeitsverteilung der mittleren Durchmesser der gesamten Neuronenpopulation im TG (grün) und der retrograd markierten Neurone (blau) nach Injektion des Tracers in die Muskelsehne, den Muskel-Sehnenübergang und den Muskelbauch.

3.4 Immunhistochemische Charakterisierung von retrograd markierten Trigemulusneuronen

In einer weitergehenden Versuchsserie wurden die tracer-markierten Neurone im TG mit Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen näher charakterisiert.

Der Tracernachweis auf CTB oder WGA nach Augenmuskelinjektion wurde entweder mit anti-Parvalbumin (PV) oder mit anti-Substanz P (SP) kombiniert. In einem Kontrollversuch wurde der Tracer in die Konjunktiva injiziert, um möglicherweise neu imponierende Zellpopulationen abgrenzen zu können. Nachfolgend werden die Ergebnisse für PV-positive und SP-positive Populationen beschrieben.

		PV	Tracer/PV	SP	Tracer/SP
32-473 Muskelbauch	Nges	82		/	/
	Doppelmarkiert	7	8,54%	/	/
ZN 10 Muskelbauch	Nges	353		449	
	Doppelmarkiert	21	5,95%	49	10,91%
ZK 04 Muskelbauch/ Muskelsehne	Nges	203		196	
	Doppelmarkiert	6	3,00%	59	30,10%
32-473 Konjunktiva	Nges	227		205	
	Doppelmarkiert	22	9,69%	87	42,44%

Tab. 4: Übersicht über die Anzahl der tracer-markierten TG-Neurone in 4 Fällen und die jeweils anteiligen Populationen von PV-positiven tracer-markierten Neuronen und SP-positiven tracer-positiven Zellen. Nges = Anzahl der gesamten Population PV oder SP positiver Neurone im TG.

3.5 Parvalbumin-positive Neurone

3.5.1 Parvalbumin-positive Population nach Tracerinjektion in Muskelbauch und Muskel-Sehnen-Übergang

In allen Fällen konnte mit Immunfluoreszenzfärbungen eine Gruppe Parvalbumin-positiver Neurone innerhalb der zum Augenmuskel projizierenden Neurone identifiziert werden, die beide Fluorochrome enthalten. Dazu zeigt Abb. 11 (A, B; C, D, Pfeile) in einem Bildpaar desselben Schnitts, jeweils unter verschiedenen Fluoreszenz-Beleuchtungen aufgenommen, ein Beispiel für große tracer-markierte PV-positive Neurone, die den Augenmuskel innervieren. Die PV-positiven Neurone

zeigten keine besondere Lokalisation im ophthalmischen Teil der TG, sondern lagen mit den anderen tracer-markierten TG-Neuronen vermischt (Abb. 12 A-D).

Bei allen Augenmuskelinjektionen erwies sich nur eine kleine Population (3%-8,54 %) der tracer-markierten TG-Neurone als PV-positiv (Tabelle 4). Dabei zeigte die systematische morphometrische Analyse, dass sowohl kleinere Neurone, als auch ein paar wenige große tracer-markierte TG-Neurone PV enthielten (Abb. 14-16).

3.5.2 Parvalbumin-positive Population nach Tracerinjektion in die Konjunktiva.

Nach Tracerinjektion in die Konjunktiva zeigte sich, bei 22 doppelmarkierten Neuronen mit einem prozentualen Anteil von 9,69% eine vergleichsweise große Subpopulation kleiner Zellen, die zusätzlich PV enthielten (Tab. 4). Auch hier ließ sich keine bevorzugte Lokalisation PV-positiver Neurone im TG erkennen (Abb.13 A-F). Im Hinblick auf die mittleren Durchmesser zeigte sich ein ähnliches Größenprofil wie nach Injektion in den Augenmuskel (Vergleiche Abb. 14-16 mit 17).

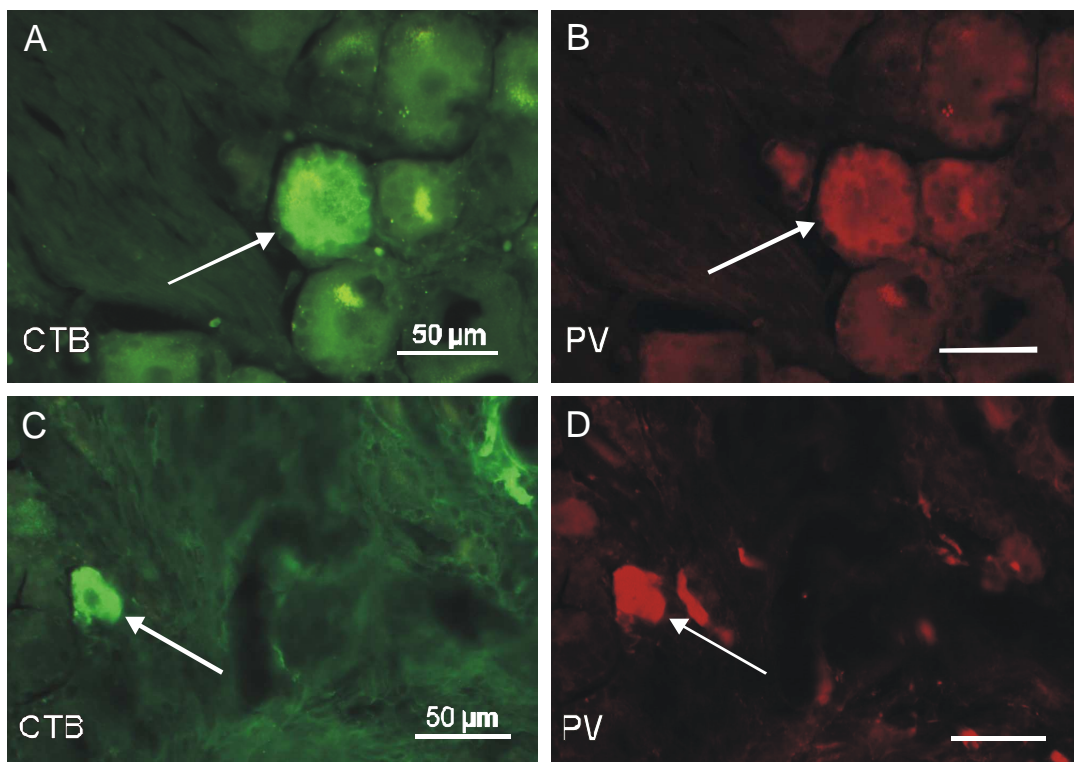


Abb. 11: Detailabbildungen von CTB/PV doppelmarkierten Neuronen

Die Abbildungen A und B, bzw. C und D zeigen jeweils die gleiche Zelle (Pfeil) mit unterschiedlicher Fluoreszenzbeleuchtung. Die retrograd markierten CTB-positiven Neurone (grün) enthalten PV (rot). Bildpaar A, B zeigt ein großes PV-positives TG-Neuron nach Injektion in den Augenmuskel (ZK 04), Bildpaar C, D zeigt ein kleines PV-positives TG-Neuron nach Tracerinjektion in die Konjunktiva (32-473).

Lokalisation PV-positiver TG-Neurone nach Augenmuskelinjektion (ZK04)

Lateral

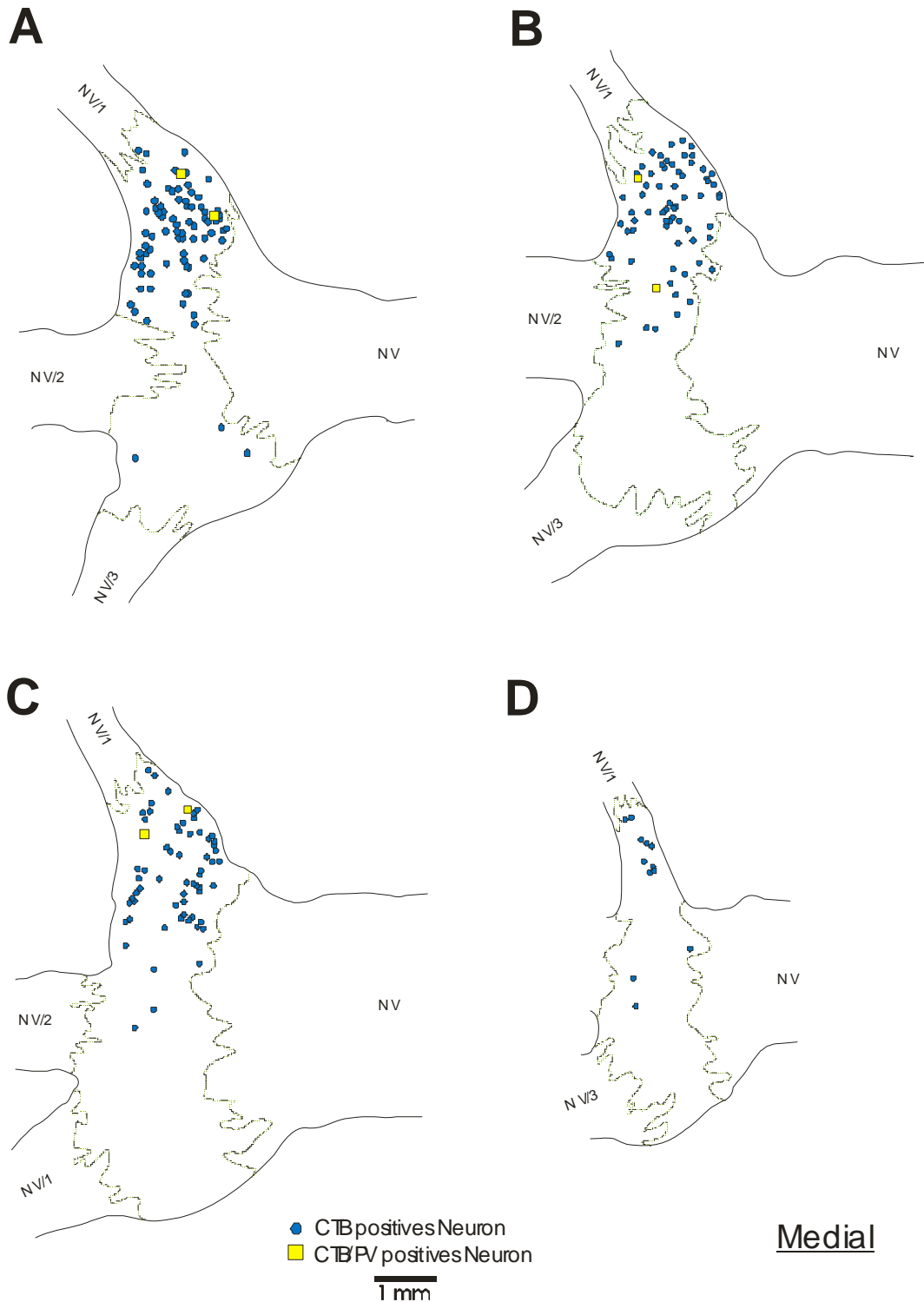
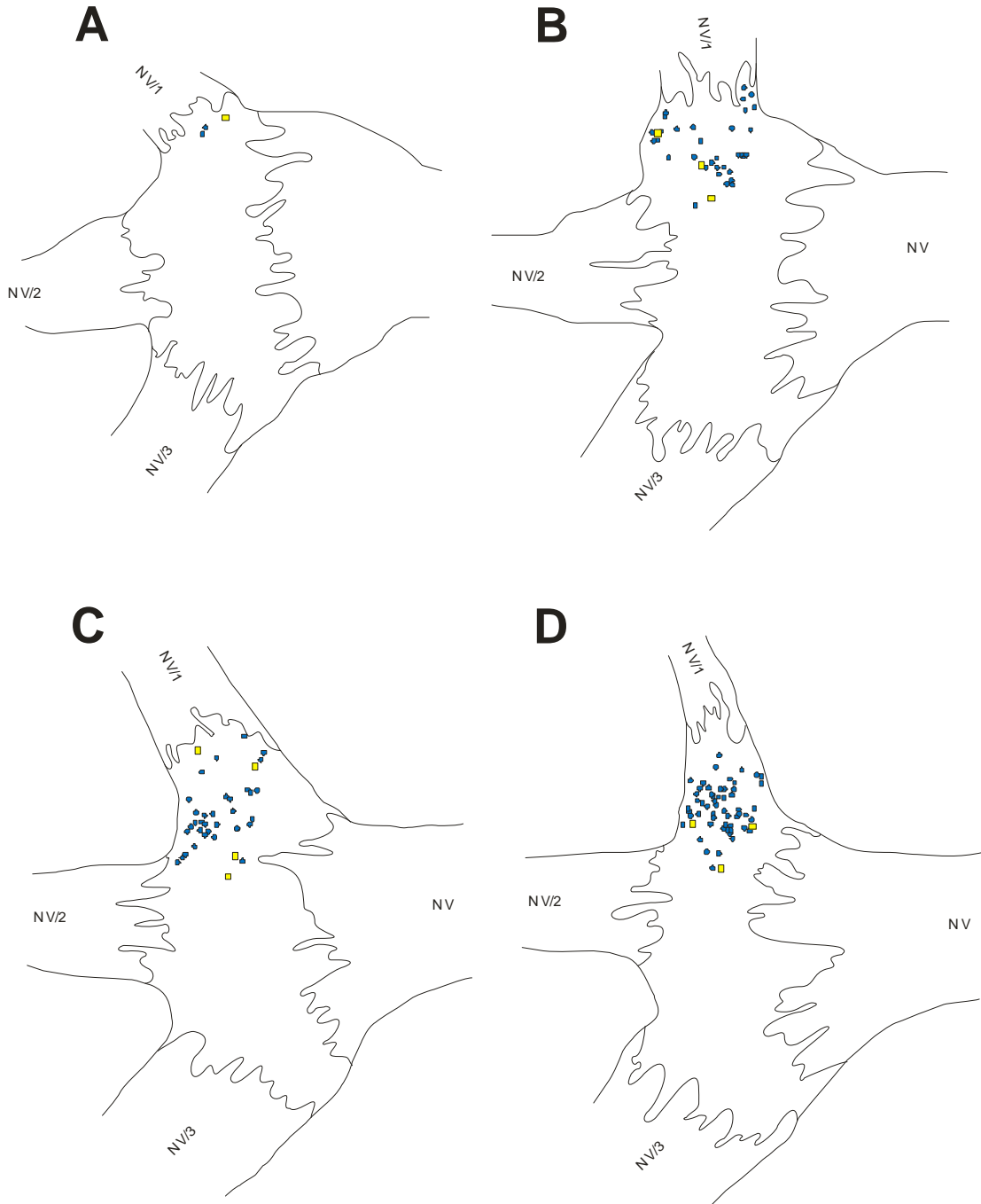


Abb. 12: Längsschnittserie A-D durch das TG im Fall ZK 04

Lokalisation CTB-positiver Neurone (blauer Punkt) und CTB/PV-positiver Neurone (gelbes Quadrat) im ophthalmischen Teil des TG nach Tracerinjektion in den Muskelbauch und den Muskel-Sehnenübergang eines Augenmuskels. N V: Nervus Trigemius; N V3: Nervus mandibularis; N V2: Nervus maxillaris; N V1: Nervus ophthalmicus

Lokalisation PV-positiver TG-Neurone nach Konjunktiva-Injektion (32-473)

Lateral



Medial

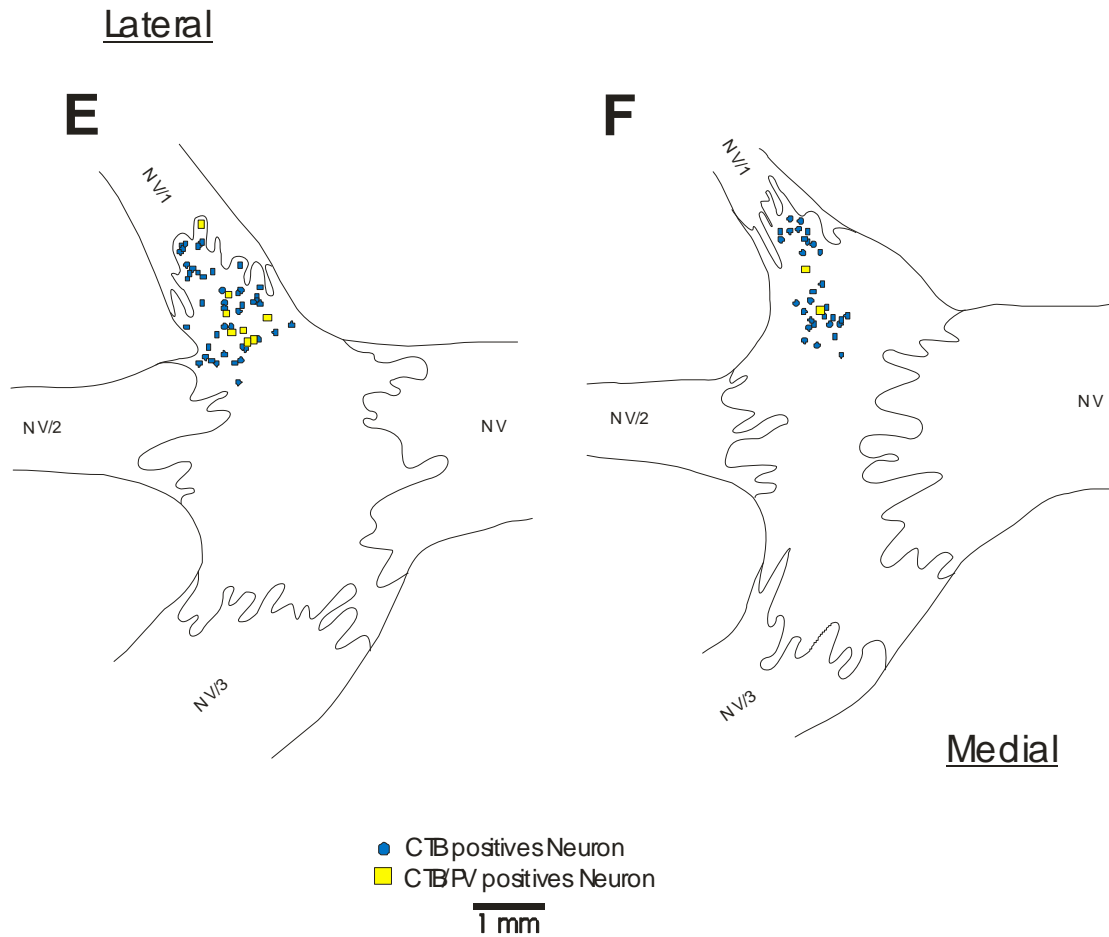


Abb. 13: Längsschnittserie A-F durch das TG im Fall 32-473

Lokalisation CTB-positiver Neurone (blauer Punkt) und CTB/PV-positiver Neurone (gelbes Quadrat) im ophthalmischen Teil des TG nach Tracerinjektion in die Konjunktiva. N V: Nervus Trigemius; N V3: Nervus mandibularis; N V2: Nervus maxillaris; N V1: Nervus ophthalmicus.

Zellgrößenprofile der PV- und tracer-positiven TG-Neurone

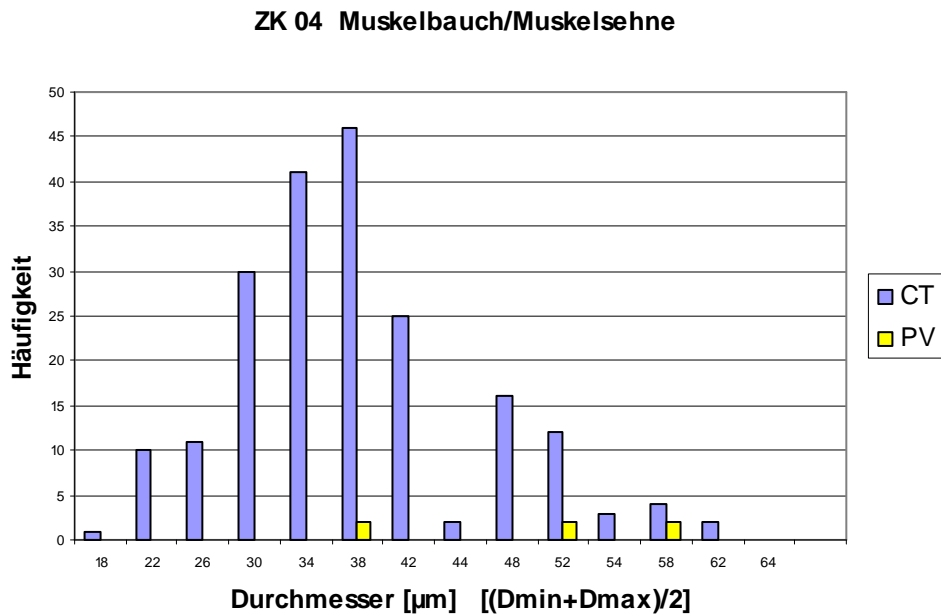


Abb. 14: Histogramm ZK 04 distal und zentral; CTB/PV

Zellgrößenprofil der markierten CTB-positiven (blau) und der PV-positiven Neurone (gelb) im TG nach Injektion des Tracers in die Muskelsehne, den Muskelsehnenübergang und den Muskelbauch des LR.

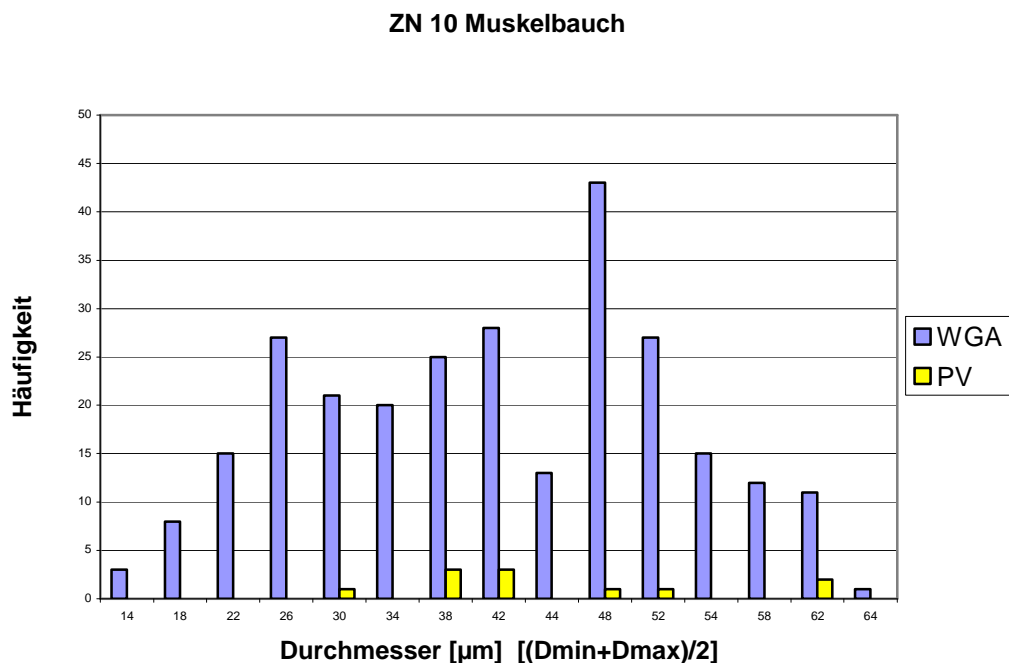


Abb. 15: Histogramm ZN 10 Muskelbauch; WGA/PV

Zellgrößenprofil der retrograd markierten WGA-positiven (blau) und der PV-positiven Neurone (gelb) im TG nach einer Injektion des Tracers in die Muskelbauch des M. obl. inf.

32-473 Muskelbauch

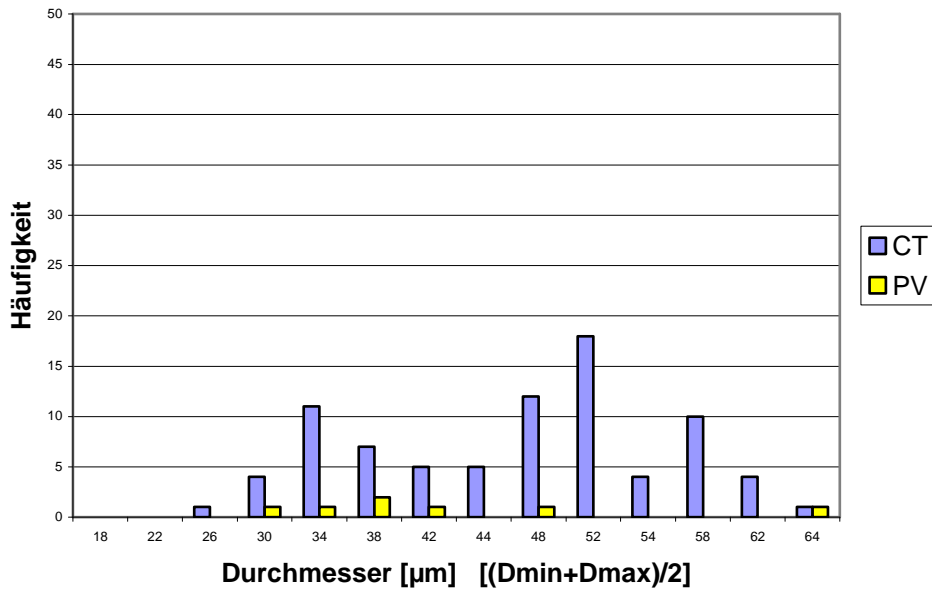


Abb. 16: Histogramm 32-473 Muskelbauch; WGA/PV

Häufigkeitsverteilung der mittleren Durchmesser der retrograd markierten CTB-positiven Neurone im TG (blau) und der PV-positiven Neurone (gelb) nach Injektion des Tracers in den Muskelbauch.

32-473 CT/PV Konjunktiva

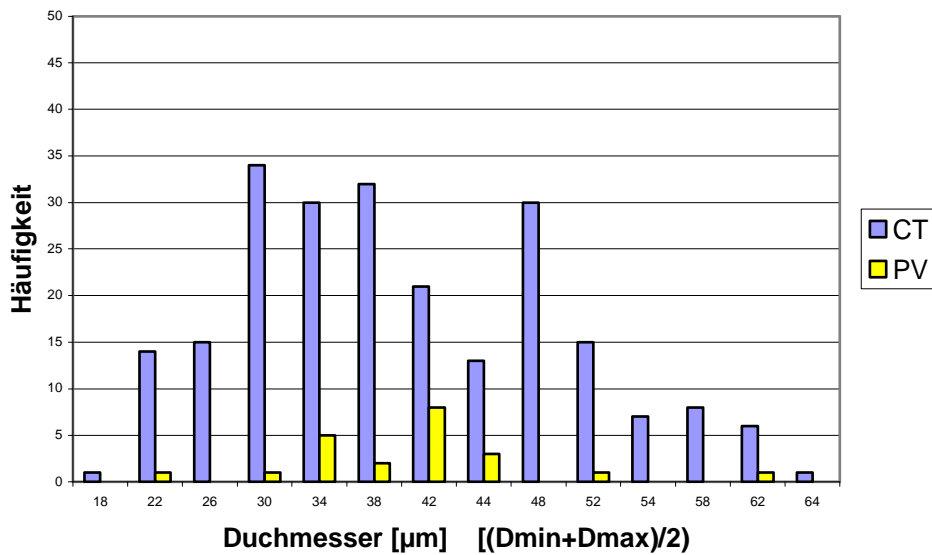


Abb. 17: Histogramm 32-473 Konjunktiva; CTB/PV

Häufigkeitsverteilung der mittleren Durchmesser der retrograd markierten CTB-positiven Neurone im TG (blau) und der PV-positiven Neurone (gelb) nach Injektion des Tracers in die Konjunktiva.

3.6 Substanz P- positive Neurone

3.6.1 Substanz P-positive Population nach Tracerinjektion in Muskelbauch und Muskelsehnenübergang

Die Analyse der Schnitte auf doppelmarkierte, Tracer- und Substanz P-positive Zellen zeigte eine solide Population der Trigemini-Ganglion-Neurone, die den Augenmuskel innervieren und Substanz P (SP) enthalten (Abb. 18). Unabhängig vom Injektionsort lagen die doppelmarkierten Neurone gleichmäßig verteilt innerhalb des ophthalmischen Teils des TG (Abb.19 A-D). Nach einer Tracerinjektion in den Muskelsehnenübergang und Muskelbauch (ZK04) fand sich mit 30,1 % eine größere Population SP-positiver Neurone als nach einer reinen Muskelbauchinjektion (ZN10) mit 10,9 %.

Bei allen Muskelinjektionen umfassten die SP-positiven Neurone eher eine Population kleiner Neurone, und nur vereinzelt großer Zellen (Abb. 21 und 22).

3.6.2 SP-positive Population nach Tracerinjektion in die Konjunktiva

Die Analyse der Augenmuskelkerne zeigte, dass nach einer Injektion in die Konjunktiva auch einige äußere Augenmuskeln Tracer aufgenommen hatten (Tab. 1). Bei der Analyse des TG fand sich eine große Population (42,44 %) SP-positiver Neurone, die mit Tracer markiert war (Tab. 4). Auch in diesem Fall lagen die doppelmarkierten Neurone verteilt innerhalb des ophthalmischen Teils des TG, ohne erkennbare Vorzugslokalisation (Abb. 20 A-F). Die Analyse der Zellgrößen zeigte, dass sich nach Injektion in die Konjunktiva neben der Subpopulation kleiner Neurone (22µm bis 38µm) zusätzlich eine kleine Gruppe mittelgroßer Zellen (42µm und 48µm) fand (Abb. 23)

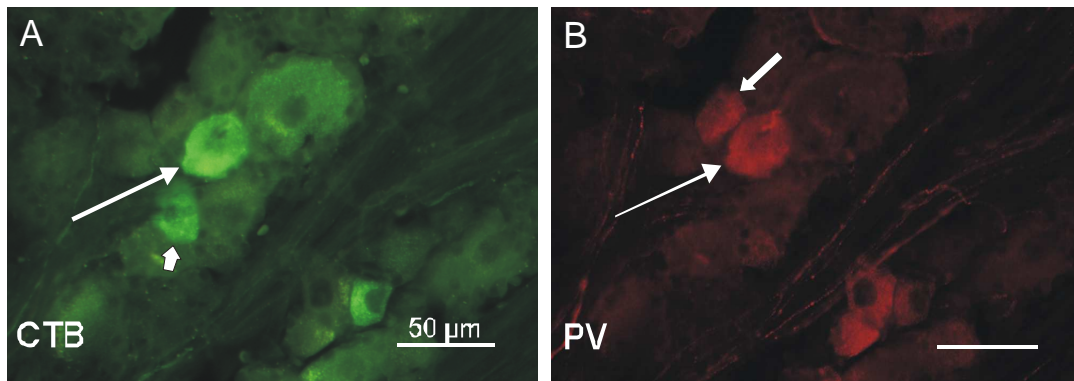


Abb. 18: Detailabbildungen von CTB/SP doppelmarkierten Neuronen

Die Abbildungen A und B, zeigen jeweils die gleiche Zelle (langer dünner Pfeil) mit unterschiedlicher Fluoreszenzbeleuchtung. Die retrograd markierten CTB-positiven Neurone (grün) enthalten SP (rot). Sie gehören zur Population der kleinen bis mittelgroßen Neurone, die nach Injektion in den Augenmuskel und in die Konjunktiva zu finden waren. Neben der doppelmarkierten Zelle (langer dünner Pfeil) findet sich eine einfach markierte CTB-positive Zelle (grün, kurzer dicker Pfeil) und eine SP-positive Zelle ohne CTB (rot, langer dicker Pfeil).

Lokalisation SP-positiver TG-Neurone nach Augenmuskelinjektion (ZK 04)

Lateral

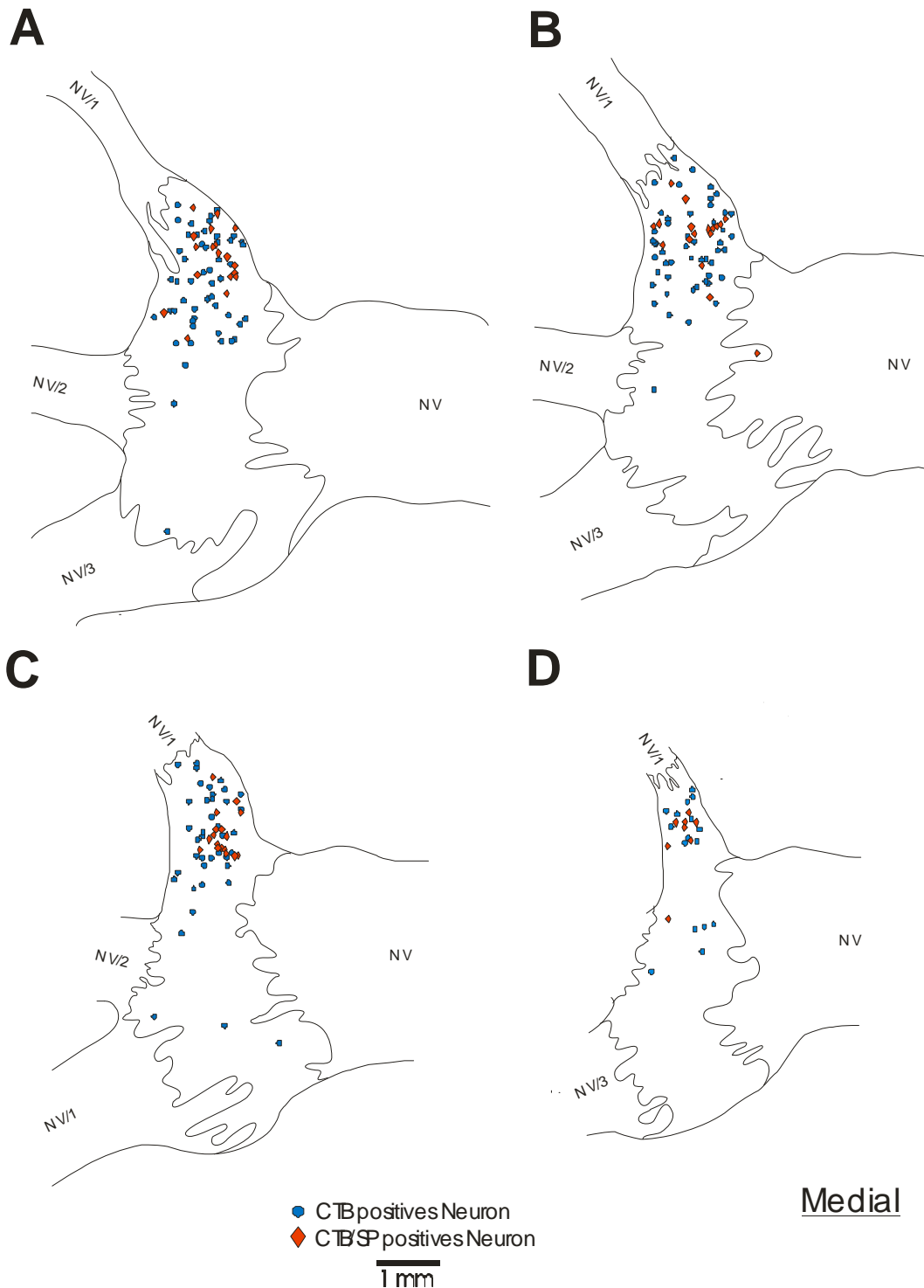
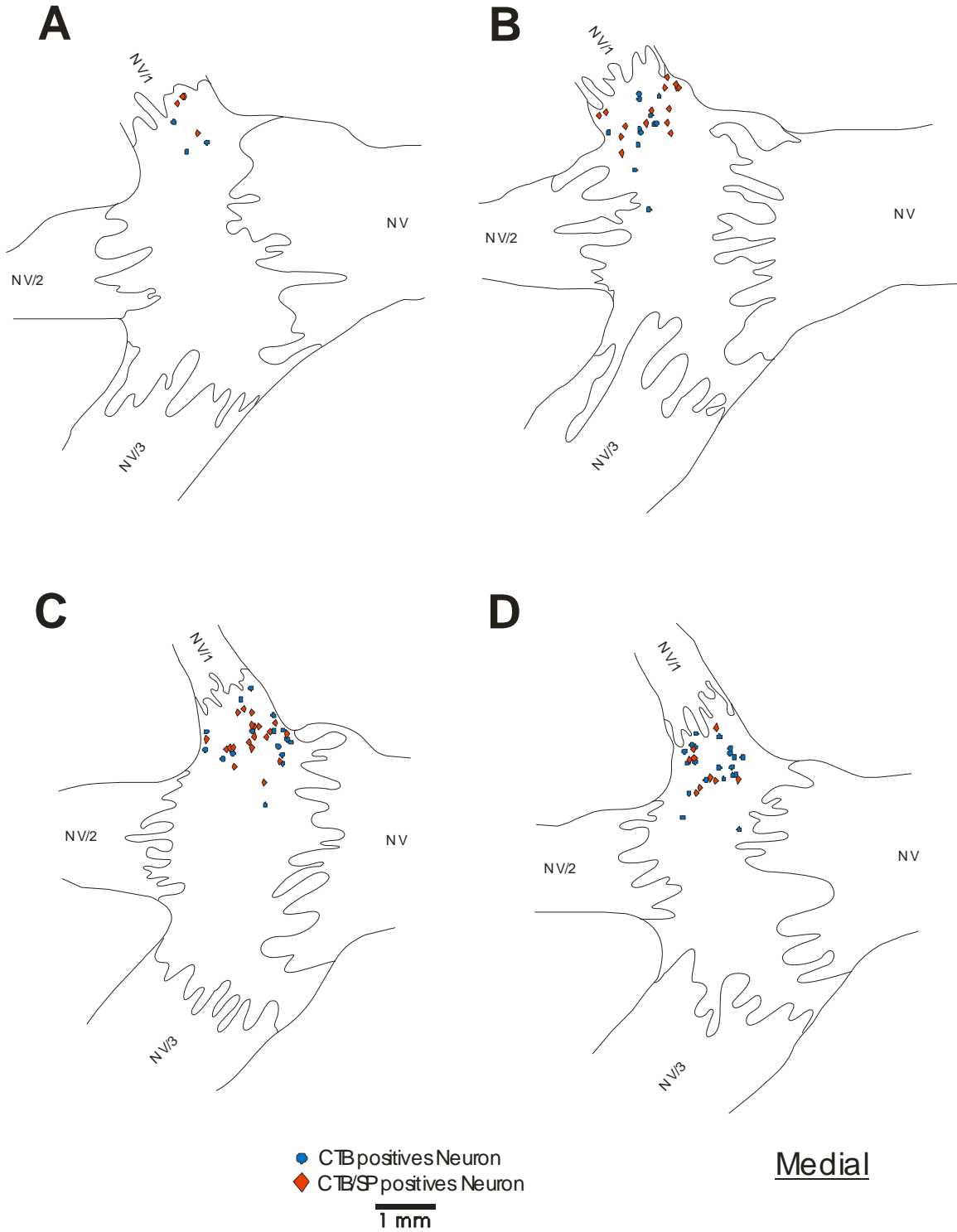


Abb. 19: Längsschnittserie A-D durch das TG im Fall ZK 04

Lokalisation CTB-positiver Neurone (blauer Punkt) und CTB/SP-positiver Neurone (rote Raute) im ophthalmischen Teil des TG nach Tracerinjektion in den Muskelbauch und den Muskel-Sehnenübergang. N V: Nervus Trigemini; N V3: Nervus mandibularis; N V2: Nervus maxillaris; N V1: Nervus ophthalmicus

Lokalisation SP-positiver TG-Neurone nach Konjunktiva-Injektion (32-473)

Lateral



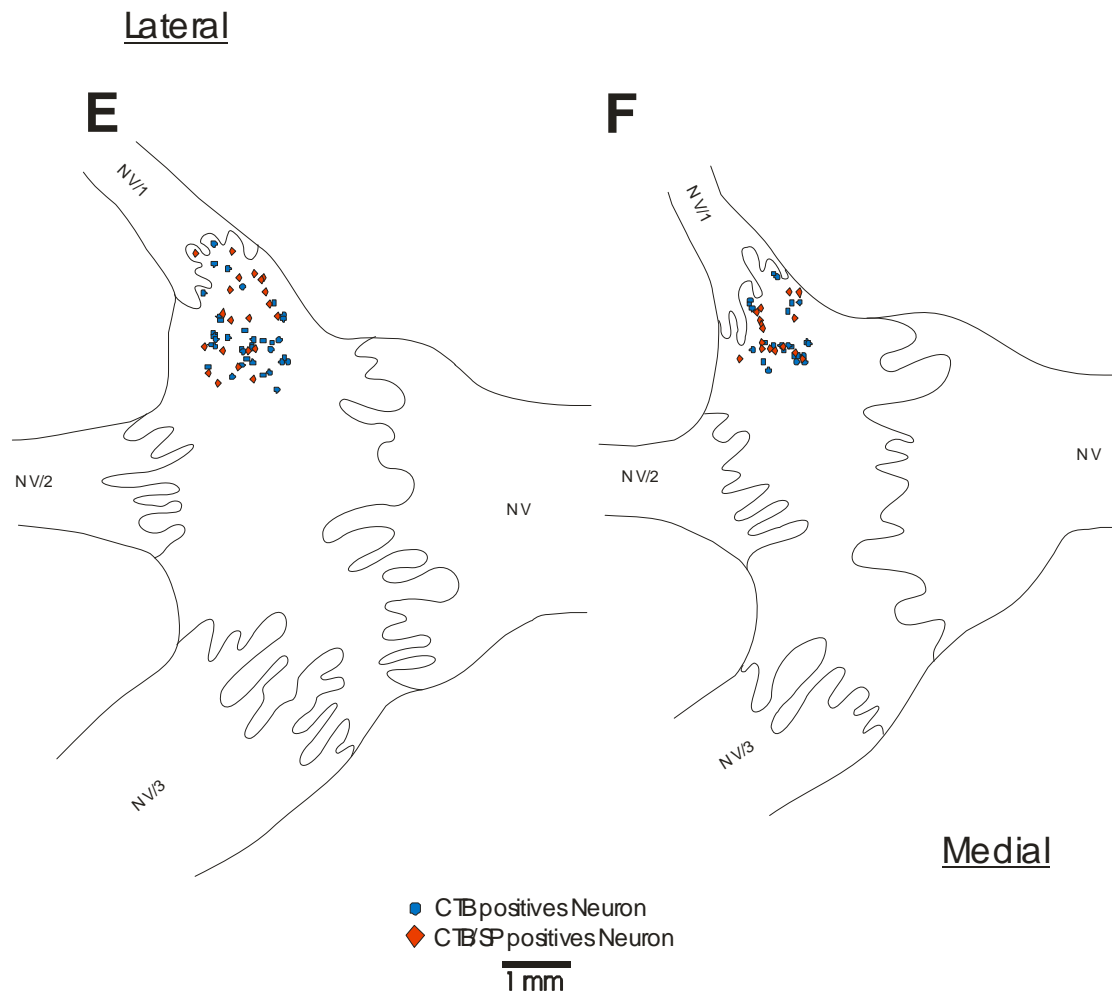


Abb. 20: Längsschnittserie A-F durch das TG im Fall 32-473
Lokalisation CTB-positiver Neurone (blauer Punkt) und CTB/SP-positiver Neurone (rote Raute)
im ophthalmischen Teil des TG nach Tracerinjektion in die Konjunktiva. N V: Nervus
Trigeminus; N V3: Nervus mandibularis; N V2: Nervus maxillaris; N V1: Nervus ophthalmicus.

Zellgrößenprofile der SP- und tracer-positiven TG-Neurone

ZK 04 Muskelbauch/Muskelsehne

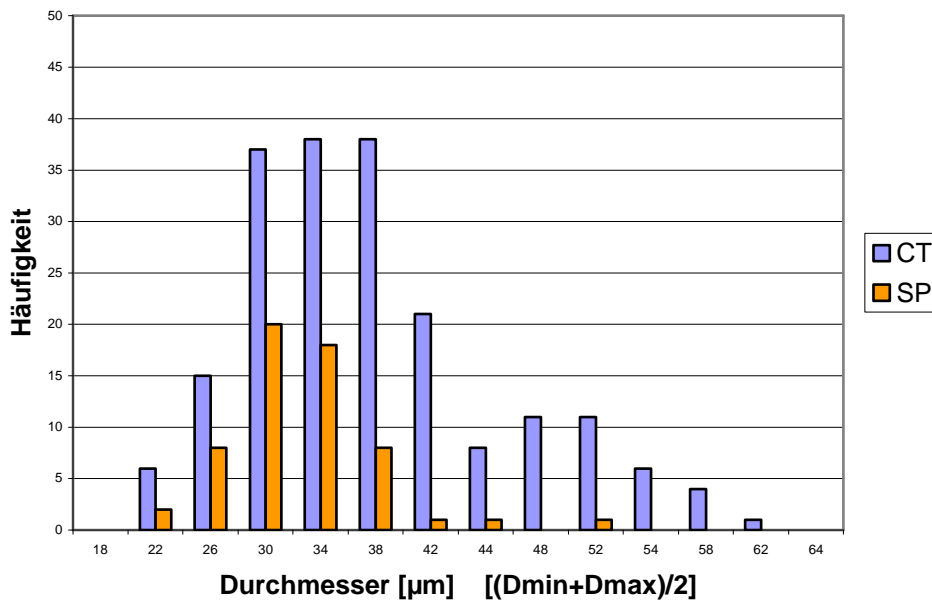


Abb. 21: Histogramm ZK 04 Muskelbauch/Muskelsehne; CTB/SP

Häufigkeitsverteilung der mittleren Durchmesser der retrograd markierten CTB-positiven Neurone im TG (blau) und der SP-positiven Neurone (rot) nach Tracerinjektion in die Muskelsehne, den Muskelsehnenübergang und den Muskelbauch.

ZN 10 Muskelbauch

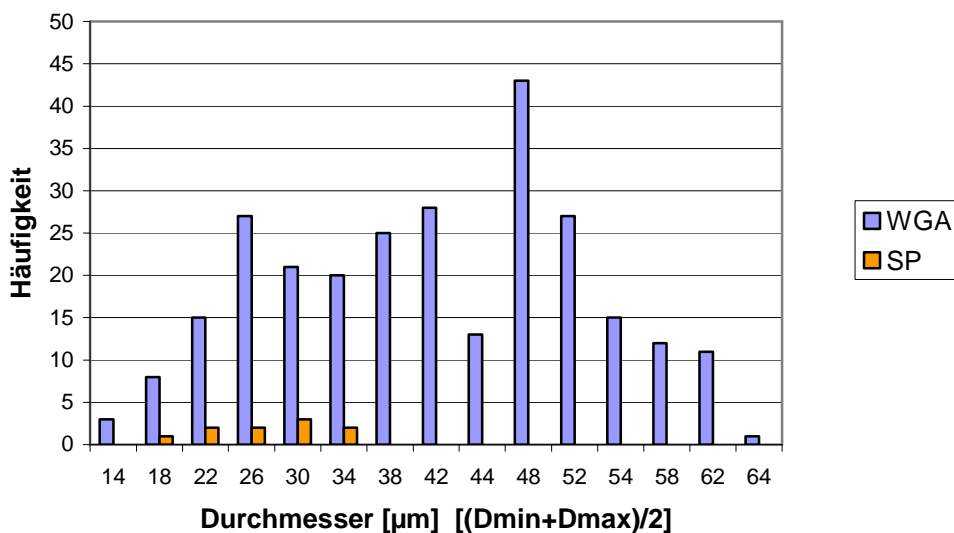


Abb. 22: Histogramm ZN 10 Muskelbauch; WGA/SP

Häufigkeitsverteilung der mittleren Durchmesser der retrograd markierten CTB-positiven Neurone im TG (blau) und der SP-positiven Neurone (rot) nach Tracerinjektion in die Muskelbauch (IO).

32-473 Konjunktiva CT/SP

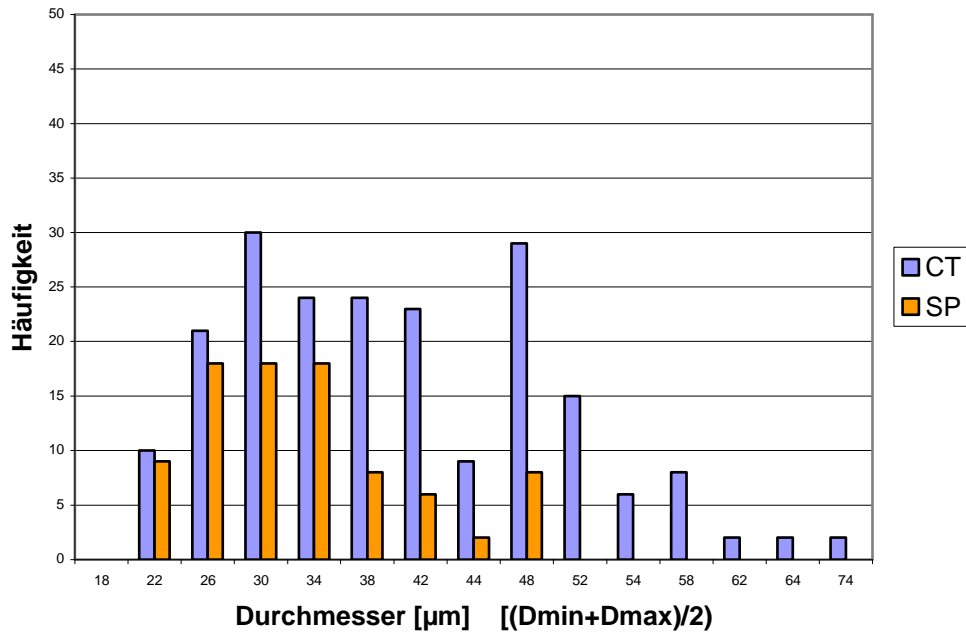


Abb. 23: Histogramm 32-473 Konjunktiva; CTB/SP

Häufigkeitsverteilung der mittleren Durchmesser der retrograd markierten CTB-positiven Neurone im TG (blau) und der SP-positiven Neurone (rot) nach Tracerinjektion in die Konjunktiva.

4 Diskussion

In der vorgelegten Arbeit wurden erstmals mit Hilfe immunhistochemischer Doppelfärbungen, retrograd markierte sensible Neurone im Trigeminus-Ganglion (TG) charakterisiert, die den äußeren Augenmuskel innervieren. Es konnten nach Tracerinjektion in den Augenmuskel oder in die Konjunktiva durch die Verwendung von Antikörpern gegen Parvalbumin (PV) und Substanz P (SP) als Marker zwei Subpopulationen im TG identifiziert werden. Dabei fand sich eine kleine Population an sowohl kleinen als auch großen PV-positiven Neuronen und eine größere Population SP-positiver eher kleiner Zellen.

4.1 Tracerinjektionen und Tracer-Kontamination der umliegenden Strukturen

Alle Tracerinjektionen in den Augenmuskel führten zu retrograden Markierungen der sensiblen Neurone im Trigeminus-Ganglion, wie bereits von anderen Autoren beschrieben (Porter, 1986; Buisseret-Delmas und Buisseret, 1990). Da auch die motorischen Endplatten dem Tracer ausgesetzt waren, führten die Injektionen zusätzlich zu retrograd markierten Motoneuronen in den Augenmuskelkernen (Büttner-Ennever, 2006). Die Analyse der markierten Motoneurone zur Beurteilung der tatsächlichen Traceraufnahme wurde einer Untersuchung der Tracermarkierung in allen Augenmuskeln vorgezogen, da sie bereits die erfolgreiche Traceraufnahme anzeigte. Die Tatsache, dass nach den Tracerinjektionen in die Augenmuskeln in den zugehörigen Hirnnervenkernen markierte Neurone, und nach Tracerinjektion in die Konjunktiva im TG markierten Neurone zu identifizieren waren, kann als Indiz für gelungene Injektionsversuche gewertet werden. Die Ergebnisse zeigen jedoch in allen Fällen, dass eine selektive Markierung der Neurone aus nur einem Augenmuskel oder die ausschließliche Markierung der Neurone aus der Konjunktiva mit den verwendeten Methoden nicht möglich war. Trotz vorbeugender Maßnahmen, wie die Abschirmung der injizierten Muskeln durch Parafilm, konnte anhand der Anfärbung zusätzlich angefärbter Motoneurone gefolgert werden, dass zum injizierten Muskel benachbarte Muskeln ebenfalls Tracer aufgenommen hatten. Daraus lässt sich folgern, dass dementsprechend auch deren sensible Neurone im TG markiert wurden.

4.2 Lokalisation retrograd markierter Neurone im Trigeminus-Ganglion

Die Markierung pseudounipolarer Neurone im ipsilateralen Trigeminus-Ganglion (TG) nach Tracerinjektion in den Augenmuskel bestätigt die mehrfach in der Literatur beschriebenen Ergebnisse einer selektiven Markierung an Neuronen im ophthalmischen Teil des Trigeminus-Ganglions in verschiedenen Spezies (Meerschweinchen: Aigner et al., 2000; Katze: Alvarado-Mallart und Pincon Raymond, 1979; Porter und Spencer, 1982; Bortolami et al., 1987; Schaf: Bortolami et al., 1987; Affe: Porter et al., 1983). In Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Porters Untersuchungen an Katze und Affe (Porter und Spencer, 1982; Porter et al., 1983) fanden wir eine nahezu gleichmäßige Verteilung der Zellen über das gesamte Areal des ophthalmischen Teils des Ganglions. Ungeachtet ob die Tracerinjektion in den LR oder den MR erfolgte, zeigte sich ein ähnliches Markierungsmuster im TG, was die Ergebnisse aus Porters Untersuchungen bestätigt (Porter et al., 1983), bei denen im Affen keine somatotopische Repräsentation der einzelnen äußeren Augenmuskeln im TG beschrieben wurde. Entsprechende Tracerversuche in anderen Tieren liefern Hinweise für eine somatotopische Anordnung der sensiblen Neurone im TG von Meerschweinchen (Aigner et al., 2000), Schweinen (Bortolami et al., 1987; Aigner et al., 2000) und im Schaf (Bortolami et al., 1987). Letztlich liefern die hier vorliegenden Ergebnisse keinen abschließenden Befund zu einer möglichen Somatotopie der äußeren Augenmuskeln im TG des Rhesusaffen, da die Versuche diese Fragestellung nicht systematisch untersucht haben, und die im TG gefundenen markierten Neurone durch versuchsbedingte Tracerkontamination der angrenzenden Strukturen kein streng selektives Bild nur eines Augenmuskels zeigen.

Ein weiterer Teilaspekt der vorliegenden Arbeit war die Frage nach der Abgrenzbarkeit in der Beurteilung des Markierungsmusters zwischen einer Tracerinjektion in den Augenmuskel und einer versuchsbedingten Tracerkontamination der Konjunktiva. Hier zeigten unsere Ergebnisse nach CTB-Injektion in die Konjunktiva ebenfalls ein sehr ähnliches Verteilungsmuster der tracer-positiven Neurone im TG wie nach den Tracerinjektionen in die Augenmuskeln. Dies legt wiederum die Folgerung nahe, dass im TG des Affen keine scharfen Abgrenzungen zwischen Neuronen aus den verschiedenen Augenmuskeln und der Konjunktiva bestehen. In der uns bekannten Literatur fand sich auch im Bezug auf die

Konjunktiva kein Hinweis auf eine Somatotopie innerhalb des TG (Ruskell, 1985; Luhtala und Uusitalo, 1991; Elsås et al., 1994).

4.3 Zellgrößenprofil retrograd markierter TG-Neurone

Die Messungen der Gesamtpopulation von Neuronen im ophthalmischen Teil des TG umfasst eine große Gruppe kleinerer Zellen, und eine Gruppe mittelgroßer und großer Zellen, deren Häufigkeit mit zunehmender Größe abnimmt.

Wie im Spinalganglion werden die Zellen im Trigeminus-Ganglion in zwei morphologische Hauptklassen eingeteilt: kleine dunkle B-Zellen und große helle A-Zellen (Gaik und Farbman, 1973; Lieberman, 1976). Später wurde an Hand ultrastruktureller und cytochemischer Untersuchungen noch eine dritte Gruppe kleiner C-Zellen eingeführt (Kai-Kai, 1989). Die kleinen Zellen haben dünn myelinisierte (A-Delta) und unmyelinisierte Fasern und repräsentieren aufgrund der Leitungsgeschwindigkeit ihrer Axone vermutlich nozizeptive Neurone (Scharf, 1958; Lawson, 1992b; Lazarov, 2002). Die mittleren und großen Zellen im TG haben stark myelinisierte Fasern (A-Beta) und repräsentieren unter anderem niedrig-schwellige Mechanorezeptoren (Lazarov, 2002). Untersuchungen von Marfurt und Sugimoto in der Ratte und der Katze haben gezeigt, dass drei verschiedene Gruppen von Neuronen im TG existieren: kleine Zellen, repräsentieren sensible Hautäste, mittelgroße Zellen die kornealen Afferenzen, und große Zellen, die oralen und perioralen Ästen zugeordnet werden können (Marfurt, 1981; Sugimoto et al., 1986).

Die in vier verschiedenen Fällen vorgenommene Zellgrößenmessung der retrograd markierten Neurone im Bezug auf die Gesamtpopulation der Ganglienzellen zeigte, dass prinzipiell alle Zellgrößenklassen innerhalb der getrackten Neurone vertreten waren, mit einem größeren Anteil kleinerzelliger Neurone und einem kleinen Anteil mittelgroßer und großer Neurone. Unabhängig vom Injektionsort innerhalb des Augenmuskels zeigen alle Fälle dieselben Populationen. Der unterschiedliche Mengenanteil einer Population, kann aber nicht nur mit der Anzahl zusätzlich „kontaminierter“ Augenmuskeln erklärt werden. So zeigte Fall Y59 mit 30 % eine vergleichsweise große Population Tracer-markierter TG-Neurone, obwohl nur sehr wenig Motoneurone im Nucleus abducens, markiert waren. Die vornehmlich periphere Lage der markierten Motoneurone legt nahe, dass hier vorwiegend MIF-Motoneurone des LR den Tracer aufgenommen hatte, was wiederum darauf

hinweist, dass die Traceraufnahme hauptsächlich vom Muskelsehnenübergang erfolgt war (Büttner-Ennever et al., 2001). Fall C96014 wies sogar gar keine retrograd markierten Motoneurone auf, zeigte aber eine beachtliche Population von markierten Neuronen im TG. Diese Befunde würden darauf hindeuten, dass im distalen Muskelbereich eine verstärkte trigeminale Innervation erfolgt.

Im Unterschied zu den hier vorliegenden Ergebnissen am Affen beschreibt Porter die Gesamtpopulation an Neuronen im TG der Katze zusammengesetzt aus einem großen Anteil großer heller und einem kleineren Anteil kleiner dunkler Zellen (Porter et al., 1983). Entsprechend waren nach einer Tracerinjektion in den Augenmuskel einer Katze vorwiegend große helle Zellen markiert. Die unterschiedlichen Befunde sind nicht klar, und müssen möglicherweise Speziesunterschieden zugeschrieben werden.

4.4 Immunhistochemische Charakterisierung der markierten Zellen im TG

Obwohl zahlreiche Untersuchungen über histochemisch charakterisierte Neuronenpopulationen im TG bei verschiedenen Tierspezies vorliegen (Del Fiacco et al., 1990; Ichikawa et al., 1994; Lazarov, 2002; Ambalavanar et al., 2003), liefert die vorliegende Arbeit erstmals Daten zur histochemischen Charakterisierung von TG-Neuronen, die die äußeren Augenmuskeln innervieren.

4.4.1 Parvalbumin-positive Neurone im Trigeminus-Ganglion

In Übereinstimmung mit Arbeiten an der Ratte fanden sich in der vorliegenden Arbeit Parvalbumin-positive Neurone gleichmäßig über das gesamte TG verteilt (Lazarov, 2002). Eine ermittelte Gesamtpopulation von etwa 30% bis 50% PV-positiver Zellen im maxillären Teil des TG der Ratte entspricht den hier gemachten Beobachtungen am Rhesusaffen (Ichikawa et al., 1995). Nach der Beschreibung früherer Arbeiten findet sich PV hauptsächlich in den großen Ganglienzellen (Celio, 1990; Ichikawa et al., 1994). Es wurde daneben jedoch auch eine distinkte Population kleiner PV-positiver Neuronen identifiziert (Celio, 1990).

Die vorliegenden Auswertungen der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen zeigten in allen Fällen, dass jeweils eine Subpopulation der zum Augenmuskel projizierenden

TG-Neurone Parvalbumin enthalten. Der Zellgrößenvergleich zeigte, dass sowohl kleine PV-positive Neurone, wie auch einige wenige große PV-positive Neurone nach einer Augenmuskelinjektion markiert wurden. Nach der Tracerinjektion in die Konjunktiva sind vergleichsweise sehr viele kleine PV-positive Neurone markiert. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Konjunktiva eher von kleinen PV-positiven Neuronen innerviert wird, und die Augenmuskeln eher von kleinen und großen PV-positiven Neuronen.

Zusammen mit Calretinin ist Parvalbumin (PV) ein weit verbreitetes intrazelluläres Calcium-bindendes Protein, das in Skelettmuskeln von Vertebraten, endokrinen Epithelien und Nervenzellen des zentralen und des peripheren Nervensystems vorkommt (Celio, 1990). In den Spinalganglien der Hinterwurzeln wurden die Calcium-bindenden Proteine, Calretinin oder Parvalbumin, in großen Neuronen als spezifische Marker für propriozeptive Neurone beschrieben (Ichikawa et al., 1994). Diese Beobachtung wird dadurch unterstützt, dass die Neurone des Ncl. mesencephalicus n. trigemini, welche die Somata der Muskelspindeln der Kaumuskulatur repräsentieren, PV enthalten (Celio, 1990; Lazarov, 2002).

Die Existenz propriozeptiver Organe im äußeren Augenmuskel ist sehr uneinheitlich, und bei einigen Spezies noch umstritten. Während beim Schaf, gut ausgebildete Muskelspindeln beschrieben sind, enthalten die Augenmuskeln von Rhesusaffen keine Muskelspindeln (Maier et al., 1974) und nur eine sehr geringe Anzahl an Golgi-Sehnenorganen (Ruskell, 1979; Donaldson, 2000; Büttner-Ennever et al., 2006). Bei allen bisher darauf untersuchten Tieren wurden als weitere mögliche Struktur für die Vermittlung sensibler Information die Palisadenendigungen am Muskelsehnenübergang identifiziert (Übersicht: (Ruskell, 1999; Donaldson, 2000; Büttner-Ennever et al., 2006). Sie sind ausschließlich mit den multipel innervierten non-twitch Muskelfasern assoziiert und von der Lage her geeignet Informationen über den Dehnungszustand der non-twitch-Fasern zu übermitteln (Ruskell, 1978; Alvarado-Mallart und Pincon Raymond, 1979). Neue Arbeiten zeigten jedoch auch, dass die Palisadenendigungen Immunoreaktivität für das Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT) enthält, und somit Acetylcholin als Transmitter nahe legt, der klassischerweise von motorischen Nervenendigungen benutzt wird (Konakci et al., 2005a; Konakci et al., 2005b). Bisherige Untersuchungen liefern keine Hinweise auf

cholinerge Neurone im Trigeminus-Ganglion (Lazarov, 2002), lediglich eine abgewandelte peripher auftretende Form von ChAT, bezeichnet als pChAT, wurde im Trigeminus-Ganglion nachgewiesen (Yasuhara et al., 2004). Die Palisadenendigungen exprimieren allerdings kein pChAT (Fackelmann, unveröffentlichte Daten).

Ichikawas Untersuchungen PV-haltiger Neurone an der Ratte beziehen sich auf den maxillären Teil des TG, wobei er in seiner Arbeit den Vorschlag einer nozizeptiven Funktion der PV-positiven Subpopulation macht (Ichikawa et al., 1995). Die Studie zeigt, dass es sich bei den primären, die Zahnpulpa innervierenden Nozizeptoren um PV-haltige Zellen handelt. Lieberman konnte nozizeptive Qualitäten speziell in den kleinen Zellen sensorischer Ganglien finden (Lieberman, 1976) und Lawson ordnete den kleinen Ganglienzellen aufgrund der Leitungsgeschwindigkeit ihrer Nervenfasern nozizeptive Eigenschaften zu (Lawson, 1992a). Ohne die Berücksichtigung der art-spezifischen Diversität, könnte dies eine Erklärung für die aus der Konjunktiva stammende Subpopulation an kleinen Zellen sein, deren Aufgabe möglicherweise darin besteht, nozizeptive Information aus der Konjunktiva zu vermitteln.

Folgende Beobachtungen deuten darauf hin, dass die kleinen PV-positiven Neurone eher aus der Konjunktiva stammen, während die großen PV-positiven Neurone wohl eher dem Augenmuskel zugeordnet werden können: nach einer Tracer-Injektion in die Konjunktiva wurden vornehmlich kleine PV-positive Neurone markiert, während nach einer Augenmuskelinjektion viel weniger, und eher große PV-positive Neurone markiert sind. Nachdem aber sowohl die Konjunktivainjektion, wie auch die Augenmuskelinjektion, zu unbeabsichtigter Traceraufnahme auch der jeweilig benachbarten Strukturen (Augenmuskel und Konjunktiva) führte, lässt sich z.B. der Anteil kleiner PV-positiver Neurone bei der Augenmuskelinjektion über Kontamination der benachbarten Konjunktiva erklären, und umgekehrt. Bei der Population aus der Konjunktiva könnte es sich um primär nozizeptive Afferenzen aus der Konjunktiva handeln, wie sie für die Ratte beschrieben wurden (Ichikawa et al., 1995). Inwieweit die PV-positiven Neurone im TG möglicherweise die Innervation über Palisadenendigungen widerspiegeln ist unklar, da die Lage der Zellkörper von Palisadenendigungen unbekannt ist.

4.4.2 Substanz P-positive Neurone im Trigeminus-Ganglion

Die im TG liegenden SP-immunreaktiven Zellen gehören laut Literatur zu den kleinen oder mittelgroßen Zellen (Hökfelt et al., 1975; Tervo et al., 1981; Del Fiacco et al., 1991) und sind gleichmäßig über das gesamte Ganglion verteilt. Die relative Anzahl SP-immunopositiver Zellen im TG variiert in verschiedenen Spezies und liegt bei ungefähr 20% bezogen auf absolute Neuronenzahl innerhalb des Ganglions (Terenghi et al. 1985). Diese Befunde decken sich mit den hier gemachten Beobachtungen, dass SP-positive Neurone auch im TG des Affen über den ophthalmischen Teil gleichmäßig verteilt sind, und einen ähnlich großen Anteil an der Gesamtpopulation haben.

Substanz P (SP) ist ein Peptid, welches in primär sensorischen Nervenzellen bei fast allen Säugern gefunden wird (Del Fiacco et al., 1990; Ng et al., 1993). Das umfaßt sowohl Ganglienzellen im Spinalganglion (Hökfelt et al., 1975; Terenghi et al., 1985), als auch im Trigeminus-Ganglion (Hökfelt et al., 1975; Cuello et al., 1978). SP kann als Transmitter fungieren (Konishi et al., 1985; Lembeck, 1985), ebenso wird dem Neuropeptid, durch die Anwesenheit in nozizeptiven Afferenzen, eine Rolle in der Vermittlung von Schmerzinformation über kleinkalibrige primär afferente Fasern und der Amplifikation eines Schmerzsignals zugeschrieben (Hunt und Rossi, 1985; Levine et al., 1993). Durch die Übermittlung sensorischer Information von peripher nach zentral, ist SP auch an der direkten neurogenen Vasodilatation beteiligt (McCarthy und Lawson, 1989). Eine indirekte Vasodilatation wird über die synergistische Wirkung sensorischer Opiode und SP, die zur Ausschüttung von Histamin führt, vermittelt (Foreman, 1987).

In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten an anderen Spezies ist SP eher in kleinen und mittelgroßen Neuronen des TG enthalten (Hökfelt et al., 1975; Tervo et al., 1981; Del Fiacco et al. 1991). Die vorliegenden Tracerversuche zeigen erstmals eine Innervation des Augenmuskels und der Konjunktiva von SP-haltigen trigeminalen Afferenzen aus dem TG. In Anlehnung an die Befunde früherer Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen repräsentieren die SP-positiven TG-Neurone vermutlich nozizeptive Afferenzen (Lieberman, 1976; Lawson, 1992b).

Entsprechend den Befunden bei der Ratte finden sich SP-positive Zellkörper der sensorischen Afferenzen aus der Konjunktiva des Rhesusaffen im ophthalmischen Teil des TG (Luhtala und Uusitalo, 1991; Elsås et al., 1994). Genauso wie im Augenmuskel könnten diese Neurone spezifisch die Übermittlung von Schmerzsignalen übernehmen.

SP ist aber auch indirekt an der Vasodilatation und einer Permeabilitätserhöhung der Blutgefäße beteiligt, indem es die Ausschüttung von Histamin steuert (Johnson und Erdös, 1973; Lembeck und Holzer, 1979; Fewtrell et al., 1982). Zumindest ein Teil der hier beschriebenen SP-haltigen Neurone könnte an der Vasodilatation der Blutgefäße im Augenmuskel beteiligt sein. Dazu konnten kürzlich in der Ratte SP-positive Nervenfasern an Blutgefäßen im Augenmuskel nachgewiesen werden (Eberhorn et al., 2005c).

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Population aus dem Augenmuskel und der Population aus der Konjunktiva konnte im Bezug auf die Zellgröße nicht beobachtet werden. Lediglich die relative Zellzahl differierte (Abb. 21-23): Während im Fall ZN 10 nach Tracerinjektion in den Muskelbauch 10,91% der retrograden Neurone SP exprimierten fanden wir in ZK 04 nach Injektion in den Muskelbauch und den Muskel-Sehenübergang 30% CTB/SP positive Neurone, beziehungsweise 42% doppel-markierte Zellen nach Injektion in die Konjunktiva. Dies legt nahe, dass nozizeptive Information eher aus dem distalen Bereich des Augenmuskels stammen ebenso wie nozizeptive Information aus der Konjunktiva.

5 Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit wurden erstmals sensiblen Neurone im Trigeminus-Ganglion, welche den Augenmuskel innervieren histochemisch charakterisiert. Dazu wurden Tracer in den äußeren Augenmuskel injiziert, und die retrograd markierten primär afferenten sensiblen Neurone im Trigeminus-Ganglion mit Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen gegen Parvalbumin und Substanz P näher charakterisiert. Als Kontrollversuch wurde das Trigeminus-Ganglion nach einer Tracerinjektion in die Konjunktiva auf die gleichen Marker untersucht, um zu beurteilen, ob die im Trigeminus-Ganglion auffindbaren retrograd markierten Neurone auch durch eine Tracerkontamination der Konjunktiva bedingt sein könnten.

Es zeigt sich, sowohl nach der Tracerinjektion in den äußeren Augenmuskel, als auch in die Konjunktiva eine Parvalbumin-positive Subpopulation. Aus dem äußeren Augenmuskel erhält man große und kleine Parvalbumin-positive Zellen, während eine Klasse an kleinen Parvalbumin-positiven Zellen in der Konjunktiva ihren Ursprung hat. Durch die selektive Darstellung Parvalbumin-positiver Neurone aus dem äußeren Augenmuskel sollte die Hypothese einer propriozeptiven Funktion dieser Zellgruppe geprüft werden, was sich im Verlauf der Arbeit als schwierig erwies, da Parvalbumin im TG weit verbreitet, und ein zu unspezifischer Marker ist um diese Frage zu klären. Bei der Parvalbumin-positiven Subpopulation aus der Konjunktiva könnte es sich um primär nozizeptive Neurone handeln.

Die Ergebnisse liefern im Bezug auf Substanz P die Beweise für eine, sowohl aus dem EOM, als auch aus der Konjunktiva stammende Substanz P-positive Subpopulation, die sich in ihrer Zellmorphologie nicht signifikant unterscheiden. Die Neurone aus beiden gefundenen Populationen übermitteln mit großer Wahrscheinlichkeit nozizeptive Information aus dem äußeren Augenmuskel. Der größere relative Anteil an Substanz P haltigen Zellen von 42% nach Tracerinjektion in die Konjunktiva, im Vergleich zu 30% aus dem Muskelbauch und dem Muskel-Sehenübergang des Augenmuskels, beziehungsweise 10% aus dem Muskelbauch, könnte ein Hinweis für eine eher distale Lage der Nervenendigungen der nozizeptiven Neurone sein.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Zellkörper der primär afferenten Substanz P haltigen Neurone, sowohl aus dem Augenmuskel, als auch aus der Konjunktiva in der ophthalmischen Untereinheit des Trigeminus-Ganglion liegen. Mit großer Wahrscheinlichkeit kann angenommen werden, dass es sich bei der neu entdeckten Substanz P-haltigen Subpopulation aus dem Augenmuskel um Zellen handelt, die Schmerzsignale vermittelt.

Referenzen

- Aigner M, Lukas JR, Denk MZ-GFKAMR. 2000. Somatotopic organization of primary afferent perikarya of the guinea-pig extraocular muscles in the trigeminal ganglion: A post-mortem Dil-tracing study. *Exp Eye Res* 70:411-418.
- Alvarado-Mallart RM and Pincon Raymond M. 1979. The palisade endings of cat extraocular muscles: a light and electron microscope study. *Tissue Cell* 11:567-584.
- Ambalavanar R, Moritani M, Haines A, Hilton T, Dessem D. 2003. Chemical phenotypes of muscle and cutaneous afferent neurons in the rat trigeminal ganglion. *J Comp Neurol* 460:167-179.
- Billig I, Buisseret-Delmas C, Buisseret P. 1997. Identification of nerve endings in cat extraocular muscles. *The anatomical record* 248:566-575.
- Blumer R, Konakci KZ, Brugger PC, Blumer MJF, Moser D, Schoefer C, Lukas J-R, Streicher J. 2003. Muscle spindles and Golgi tendon organs in bovine calf extraocular muscle studied by means of double-fluorescent labeling, electron microscopy, and three-dimensional reconstruction. *Exp Eye Res* 77:447-462.
- Blumer R, Wasicky R, Hötzenecker W, Lukas JR. 2001. Presence and structure of innervated myotendinous cylinders in rabbit extraocular muscle. *Exp Eye Res* 73:787-796.
- Bondi AY and Chiarandini DJ. 1983. Morphologic and electrophysiologic identification of multiply innervated fibers in rat extraocular muscles. *Invest Ophthal Vis Sci* 24:516-519.
- Bortolami R, Lucchi ML, Pettorossi VE, Callegari E, Manni E. 1987. Localization and somatotopy of sensory cells innervating the extraocular muscles of lamb, pig and cat. Histochemical and electrophysiological investigation. *Arch Ital Biol* 125:1-15.
- Brodal, A (1981) *Neurological Anatomy in Relation to Clinical Medicine*, 3rd Edition. Oxford University Press

- Brooke, MH, Kaiser, KK (1979) Muscle fiber types: How many and what kind) Arch. Neurol. 23: 369-379
- Buisseret-Delmas C and Buisseret P. 1990. Central projections of extraocular muscle afferents in cat. Neurosci Lett 109:48-53.
- Büttner-Ennever JA. 2006. The extraocular motor nuclei: organization and functional neuroanatomy. Prog Brain Res 151:95-125.
- Büttner-Ennever JA and Akert K. 1981. Medial rectus subgroups of the oculomotor nucleus and their abducens internuclear input in the monkey. J Comp Neurol 197:17-27.
- Büttner-Ennever JA, Eberhorn AC, Horn AKE. 2003. Motor and sensory innervation of extraocular eye muscles. Ann N Y Acad Sci.
- Büttner-Ennever JA and Horn AKE. 2002. The neuroanatomical basis of oculomotor disorders: the dual motor control of extraocular muscles and its possible role in proprioception. Current Opinion in Neurology 15:35-43.
- Büttner-Ennever JA, Horn AKE, Scherberger H, D'Ascanio P. 2001. Motoneurons of twitch and nontwitch extraocular muscle fibers in the abducens, trochlear, and oculomotor nuclei of monkeys. J Comp Neurol 438:318-335.
- Büttner-Ennever JA, Konakci KZ, Blumer R. 2006. Sensory control of extraocular muscles. Prog Brain Res 151:81-93.
- Büttner-Ennever JA, Streit WJ, Horn AKE. 1988. Lectins as neuroanatomical tracers. Acta Histochem Suppl XXXVI:141-151.
- Capra, NF, Anderson, KV, Atkinson, RC (1985) Localisation and morphometric analysis of masticatory muscle afferent neurons in the nucleus of the mesencephalic root of the trigeminal nerve in the cat. Acta Anat. 122: 115-125
- Celio MR. 1990. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. Neurosci 35:375-475.

- Cuello AC, Del Fiacco M, Paxinos G. 1978. The central and peripheral ends of the substance P-containing sensory neurones in the rat trigeminal system. *Brain Res* 152:499-510.
- Daunicht WJ, Jaworski E, Eckmiller R. 1985. Afferent innervation of extraocular muscles in the rat studied by retrograde and anterograde horseradish peroxidase transport. *Neurosci Lett* 56:143-148.
- Del Fiacco M, Quartu M, Floris A, Diaz G. 1990. Substance P-like immunoreactivity in the human trigeminal ganglion. *Neurosci Lett* 110:16-21.
- Del Fiacco M, Quatro M, Floris A, and Diaz G. 1991. Substance P-containing and calcitonin gene-related peptide-containing neurons in the human trigeminal ganglion: immunohistochemical detection, morphometric characterization and coexistence with peptides. In Leeman SE, Krause JE, and Lembeck F, editors. *Substance P and Related Peptides (Cellular and Molecular Physiology)*. New York: Ann. Acad. Sci. p 382-384.
- Dieringer N and Precht W. 1986. Functional organization of eye velocity and eye position signals in abducens motoneurons of the frog. *J Comp Physiol* 158:179-194.
- Dogiel AS. 1906. Die Endigungen der sensiblen Nerven in den Augenmuskeln und deren Sehnen beim Menschen und den Säugetieren. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 68:501-526.
- Donaldson IML. 2000. The functions of the proprioceptors of the eye muscles. *Philos Trans R Soc Lond [Biol]* 355:1685-1754.
- Eberhorn AC, Ardelenanu P, Büttner-Ennever JA, Horn AKE. 2005a. Motoneurons of multiply-innervated muscle fibres in extraocular muscles have different histochemical properties than motoneurons of singly-innervated muscle fibres. *J Comp Neurol* 491:352-366.
- Eberhorn AC, Horn AKE, Eberhorn N, Fischer P, Boergen K-P, Büttner-Ennever JA. 2005b. Palisade endings in extraocular eye muscles revealed by SNAP-25 immunoreactivity. *J Anat* 205:307-315.

- Eberhorn AC, Horn AKE, Fischer P, Büttner-Ennever JA. 2005c. Proprioception and palisade endings in extraocular eye muscles. *Ann N Y Acad Sci* 1039:1-8.
- Elsås T, Edvinsson L, Sundler F, Uddman R. 1994. Neuronal pathways to the rat conjunctiva revealed by retrograde tracing and immunocytochemistry. *Exp Eye Res* 58:117-126.
- Fewtrell CMS, Foreman JC, Jordan CC, Oehme P, Renner H, Stewart HM. 1982. The effects of substance P on histamine and 5-hydroxytryptamine release in rat. *J Physiol* 330:393-411.
- Foreman JC. 1987. Peptides and neurogenic inflammation. *Br Med Bull* 43:386-400.
- Gaik GC and Farbman AI. 1973. The chicken trigeminal ganglion. I. An anatomical analysis of the neuron types in the adult. *J Morphol* 141:43-56.
- Gautier, GF, Löwey, S (1979) Distributions of myosin isoenzymes among skeletal muscle fiber types. *J Cell Biol.* 81: 10-25
- Han Y, Wang J, Fischman DA, Biller HF, Sanders I. 1999. Slow tonic muscle fibers in the thyroarytenoid muscles of human vocal folds; a possible specialization for speech. *The anatomical record* 256:146-157.
- Hökfelt T, Kellerth JO, Nilsson G, Pernow B. 1975. Substance P: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science* 190:889-890.
- Hunt SP and Rossi J. 1985. Peptide- and non-peptide-containing unmyelinated primary afferents: the parallel processing of nociceptive information. *Phil Trans R Soc London B* 308:283-289.
- Ichikawa H, Deguchi T, Nakago T, Jacobowitz DM, Sugimoto T. 1994. Parvalbumin, calretinin and carbonic anhydrase in the trigeminal and spinal primary neurons of the rat. *Brain Res* 655:241-245.
- Ichikawa H, Deguchi T, Nakago T, Jacobowitz DM, Sugimoto T. 1995. Parvalbumin- and calretinin-immunoreactive trigeminal neurons innervating the rat molar tooth pulp. *Brain Res* 679:205-211.

- Ichikawa T, Ajiki K, Matsuura J, Misawa H. 1997. Localization of two cholinergic markers, choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in the central nervous system of the rat: in situ hybridization histochemistry and immunohistochemistry. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 13:23-39.
- Johnson AR and Erdös EG. 1973. Release of histamine from mast cells by vasoactive peptides. *Proc Soc Exp Biol Med* 142:1253-1256
- Kaczmarek, F (1974) Motor endplates in the extraocular muscles of small mammals *Acta Anat.* 89: 372-386
- Kai-Kai MA. 1989. Cytochemistry of the trigeminal and dorsal root ganglion and spinal cord of the rat. *Comp Biochem Physiol* 93A:183-193.
- Köbberich C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S. 2000. Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol* 62:327-351.
- Konakci KZ, Streicher J, Hoetzenecker W, Blumer MJF, Lukas J-R, Blumer R. 2005a. Molecular characteristics suggest an effector function of palisade endings in extraocular muscles. *Invest Ophthalmol* 46:155-165.
- Konakci KZ, Streicher J, Hoetzenecker W, Haberl I, Blumer MJF, Wieczorek G, Meingassner JG, Paal SL, Holzinger D, Lukas JR, Blumer R. 2005b. Palisade Endings in Extraocular Muscles of the Monkey are Immunoreactive for Choline Acetyltransferase and Vesicular Acetylcholine Transporter. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:4548-4554.
- Konishi S, Okamoto T, and Otsuka M. 1985. Substance P as a neurotransmitter released from peripheral branches of primary afferent neurons producing slow synaptic excitation in autonomic ganglion cells. In Jordan CC and Oehme P, editors. *Substance P Metabolism and Biological Actions*. London: Taylor & Francis. p 121-136.
- Lawson SN. 1992b. Morphological and biochemical cell types of sensory neurons. In Scott SA, editor. *Sensory neurons. Diversity, development, and plasticity*. New York: Oxford University Press. p 2759.

- Lawson SN. 1992a. Morphological and biochemical cell types of sensory neurons. In Scott SA, editor. Sensory neurons, diversity, development and plasticity. New York: Oxford University Press. p 27-59.
- Lazarov NE. 2002. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol* 66:19-59.
- Lembeck F. 1985. Substance P and sensory neurons. In Jordan CC and Oehme P, editors. Substance P Metabolism and Biological Actions. London: Taylor & Francis. p 137-151.
- Lembeck F and Holzer P. 1979. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. *Arch Pharmacol* 310:175-183.
- Lennerstrand G and Nichols KC. 1977. Morphology of motor units in cat extraocular muscle. *Acta Ophthalmologica* 55:913-918.
- Levine JD, Fields HL, Basbaum AI. 1993. Peptides and the primary afferent nociceptor. *J Neurosci* 13:2273-2286.
- Leonhardt, H., B. Tillmann, K. Zilles (Hrsg.): Rauber /Kopsch, Anatomie des Menschen, Bd 4, Topographie der Organsysteme , Systematik peripherer Leitungsbahnen, p 84-85. Thieme, Stuttgart - New York 1988
- Lieberman AR. 1976. Sensory ganglia. In Landon DN, editor. The Peripheral Nerve. London: Chapman & Hall. p 188-278.
- Luhtala J and Uusitalo H. 1991. The distribution and origin of substance P immunoreactive nerve fibres in the rat conjunctiva. *Exp Eye Res* 53:641-646.
- Lukas JR, Blumer R, Denk M, Baumgartner I, Neuhuber W, Mayr R. 2000. Innervated myotendinous cylinders in human extraocular muscles. *Invest Ophthal Vis Sci* 41:2422-2431.
- Maier A, DeSantis M, Eldred. 1974. The occurrence of muscle spindles in extraocular muscles of various vertebrates. *J Morph* 143:397-408.

- Marfurt CF. 1981. The somatotopical organization of the cat trigeminal ganglion as determined by the horseradish peroxidase technique. *Anat Rec* 201:105-118.
- Mayr R, Gottschall J, Gruber H, Neuhuber W. 1975. Internal structure of cat extraocular muscle. *Anat Embryol* 148:25-34.
- McCarthy PW and Lawson SN. 1989. Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with substance P-like immunoreactivity. *Neurosci* 28:745-753.
- Morgan DL and Proske U. 1984. Vertebrate slow muscle: its structure, pattern of innervation, and mechanical properties. *Physiol Rev* 64:103-138.
- Marani, E, Usunoff, KG (1998) The trigeminal motonucleus in man. *Arc. Physio. Biochem.* 106: 346-354
- Namba, T, Nakamura, T, Takahashi, A, Grob, D (1968) Motor nerve endings in extraocular muscles. *J. Comp. Neurol.* 134: 385-398
- Nelson JS, Goldberg SJ, McClung JR. 1986. Motoneuron electrophysiological and muscle contractile properties of superior oblique motor units in cat. *J Neurophysiol* 55:715-726.
- Ng YK, Wong WC, Ling EA. 1993. A qualitative and quantitative study of substance P immuno-cytochemistry of the trigeminal ganglion in the monkey. *Anat Embryol* 188:53-61.
- Peter, JB, Barnard, RJ, Edgerton, VR, Gillespie, CA, Stempel, KE (1972) Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11: 2627-2633
- Porter JD and Donaldson IML. 1991. The anatomical substrate for cat extraocular muscle proprioception. *Neurosci* 43:473-481.
- Porter JD, Guthrie BL, Sparks DL. 1983. Innervation of monkey extraocular muscles: localization of sensory and motor neurons by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 218:208-219.

- Porter JD and Spencer RF. 1982. Localization of morphology of cat extraocular muscle afferent neurones identified by retrograde transport of horseradish peroxi-dase. *The Journal of Comparative Neurology* 204:56-64.
- Ramón y Cajal, S (1909) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébré*. Vol 1 A
- Ramón y Cajal, S (1896) *Beitrag zum Studium der Medulla oblongata, des Kleinhirns und des Ursprungs der Gehirnnerven*. Johann Ambrosius Barth
- Richmond FJR, Johnston WSW, Baker RS, Steinbach MJ. 1984. Palisade endings in human extraocular muscle. *Invest Ophthal Vis Sci* 25:471-476.
- Ruskell GL. 1978. The fine structure of innervated myotendinous cylinders in extraocular muscles in rhesus monkey. *J Neurocytol* 7:693-708.
- Ruskell GL. 1979. The incidence and variety of Golgi tendon organs in extraocular muscles of the rhesus monkey. *J Neurocytol* 8:639-653.
- Ruskell GL. 1985. Innervation of the conjunctiva. *Trans Ophthalmol Soc U K* 104:390-395.
- Ruskell GL. 1990. Golgi tendon organs in the proximal tendon of sheep extraocular muscles. *Anat Rec* 227:25-31.
- Ruskell GL. 1999. Extraocular muscle proprioceptors and proprioception. *Prog Retin Eye Res* 18:269-291.
- Sas J and Schab R. 1952. Die sogenannten "Palisaden-Endigungen" der Augenmuskeln. *Acta Morph Acad Sci (Hungary)* 2:259-266.
- Sawchenko PE and Gerfen CR. 1985. Plant lectins and bacterial toxins as tools for tracing neuronal connections. *TINS* 8:378-384.
- Scharf JH. 1958. Sensible ganglien. In Möllendorff MV and Bargmann W, editors. *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Berlin: Springer. p 14-15.

- Shigenaga, Y, Mitsuhiro, Y, Yoshida, A, Qin Cao, C, Tsuru, H (1988) Morphology of single mesencephalic trigeminal neurons innervating masseter muscle of the cat. *Brain Res.* 445: 392-399
- Schaffino, S, Gorza, L, Sartore, S, Saggin, L, Ausoni, S, Vianello, M, Gundersen, K, Lomo, T (1989) Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibers. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 10: 197-205
- Shall MS, Sorg PJ, McClung JR, Gilliam EE, Goldberg SJ. 1995. Relationship of the mechanical properties of the cat inferior oblique muscle to the anatomy of its motoneurons and nerve branches. *Acta Anat* 153:151-160.
- Spencer RF and Porter JD. 1988. Structural organization of the extraocular muscles. In Büttner-Ennever JA, editor. *Neuroanatomy of the oculomotor system.* Amsterdam; New York; Oxford; Elsevier. p 33-79.
- Spencer RF and Porter JD. 2006. Biological organization of the extraocular muscles. *Prog Brain Res* 151:43-80.
- Sugimoto T, Takemura T, Sakai A, Ishimura M. 1986. Cell size analysis of trigeminal primary afferent neurons comprising individual peripheral branches of the rat mandibular nerve. *Exp Neurol* 93:565-573.
- Terenghi G, Gibson SJ, McGregor GP, Ghatei MA, Mulderry PK, Blook SR, and Polak JM. 1985. Substance P and calcitonin generelated peptide (CGRP) immunoreactivity are co-localised in primary sensory neurons. In Jordan CC and Oehme P, editors. *Substance P: metabolism and biological actions.* London; Philadelphia: Taylor & Francis. p 208.
- Tervo K, Tervo T, Eranko L, Cuello AC. 1981. Immunoreactivity for substance P in the Gasserian ganglion, ophthalmic nerve and anterior segment of the rabbit eye. *Histochem* 13:435-443.
- Tozer FM and Sherrington CS. 1910. Receptors and afferents of the third, fourth and sixth cranial nerves. *Proc R Soc London Ser* 82:451-457.
- Usunoff, KG, Marani, E, Schoen, JHR (1997) The trigeminal system in man. *Adv. Anat. Embryol. Cell Bio.* 136: 1-126

Yasuhara O, Aimi Y, Shibano A, Matsuo A, Bellier J-P, Park M, Tooyama I, Kimura H. 2004. Innervation of rat iris by trigeminal and ciliary neurons expressing pChAT, a novel splice variant of choline acetyltransferase. *The Journal of Comparative Neurology* 472:232-245.

Anhang

Lösungen:

1. Phosphat-Puffer (PBS) (für Immunhistochemie)

72.1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

13.1 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

40.0 g NaCl

1.0 g KCl

in 5 l aqua dest. lösen und den pH Wert einstellen

1. Tris Puffer (TBS) (für Immunhistochemie)

Stammlösung: Tris-Puffer 0.5 M pH 7.6

60.57 g Trizma Base in 800 ml aqua dest. lösen

mit 37% HCl pH 7.6 einstellen

mit aqua dest. auf 1 l auffüllen

Ziege anti-Choleratoxin (CT)

(Ziege anti-Choleragenoid = List Biological Laboratories, 703)

Tracer: Cholera Toxin B subunit 103 A

Fixierung: 4% Paraformaldehyd

1. Tag

Schnitte kurz in 0.1 M PBS pH 7.4 waschen 10 min

Peroxidaseblockierung: 15 min

3% H₂O₂ in PBS / 10 % Methanol

[1 ml 30% H₂O₂ + 1 ml Methanol + 8 ml PBS]

Waschen:

3 x 0.1 M PBS pH 7.4

Präinkubation: 1 h bei RT

5% Normal Rabbit Serum + 0.3% Triton in 0.1 M PBS pH 7.4

[500 µl NS + 10 ml (0.3% Triton in PBS)]

1. Antikörper

Ziege anti Choleragenoid 1:20000 1 d bei RT

2. Tag

Waschen:

3 x 0.1 M PBS pH 7.4 je 10 min

2. Antikörper:

biotinierter Kaninchen anti-Ziege 1:200

[50 µl in 10 ml PBS pH 7.4]

EAP: 30 min vorher ansetzen 1 h bei RT

Extravidin-Peroxidase 1:1000

[10 µl in 10 ml PBS]

Waschen:

2 x 0.1 M PBS pH 7.4	je 10 min
1 x 0.05 M TBS pH 8.0	10 min

Diamino-Benzidin

(DAB)-Reaktion: 10 min

0.05% DAB + 0.01% H₂O₂ in 0,05 M TBS pH 8.0

[1 ml 1% DAB-Stocklösung in 19 ml TBS pH 8.0 + 6.8 µl 30% H₂O₂]

Waschen:

3 x 0.1 M PBS pH 7.4	10 min
----------------------	--------

WGA-HRP-Nachweis mit Tetramethyl-Benzidin (TMB)

TMB = Tetramethyl benzidine (Sigma: T-2885)

WGA = Wheat germ agglutinin (Merck: 1.07210.0250)

HRP = Horse raddish peroxidase (Sigma: L-3892)

Gefrierschnitte: 40µm

- Schnitte in **kaltem** 0,1M PB, pH 7,4 auf Eis auffangen
- Schnitte 3 mal in **kaltem** aqua bidest. Spülen, je 1 min.

1- Präinkubation: 20 min präinkubieren

Für **400 ml ansetzen:** Schalen mit Alufolie abdecken

Lösung A: 370 ml a. bidest. + 20 ml Na-Acetatpuffer pH 3,3
dann kurz vorher 400 mg Natrium-Nitroferroprussiat
(Na-Nitroprusside dihydrate)

Lösung B: 10 ml absoluter unvergällter Ethanol (100%)
20 mg TMB

Kurz vor Gebrauch A und B zusammengeben.

2- Hauptinkubation: 20-40 min

Schalen mit Alufolie abdecken, kein Metal in die Lösung

Zur Präinkubationslösung dazugeben: **800 mg β -D-Glucose**
160 mg Ammoniumchlorid
2 mg Glucoseoxidase

danach 2 mal 5 min in Waschlösung spülen:

50 ml Acetatpuffer + 950 ml a.bidest.

Stabilisierung 20 min: 20 g Ammoniumheptamolybdat in 400 ml a. bidest.

Wenn keine Immunhistochemie geplant ist, Schnitte aus kaltem a. dest. aufziehen, nicht auf der Heizplatte trocknen lassen. Über Nacht im Kühlschrank lagern und am nächsten Tag entweder gegenfärben oder nur eindeckeln.

Stabilisierung für Doppelmarkierung:

Stabilisierung mit DAB-Co, wenn anschließend Immunhistochemie geplant ist: nach TMB-Reaktion und Stabilisierung in Ammoniumheptamolybdat:

- 30 sec in 0,1M PBS spülen

Lösung A: 200 mg Diamino-Benzidin in 200 ml a.bidest. lösen
200 ml 0.2M PBS pH 7.4 dazugeben

Lösung B: 80 mg Co-Chlorid in 8 ml a. bidest. lösen (1%ige Lösung)

Dann Lösung B unter kräftigem Rühren ganz langsam zu Lösung A tropfen, alles filtrieren

In die Inkubationsschale 120µl 30% H₂O₂ geben, dazu DAB-Co-Lösung geben
5-8 min inkubieren (Lösung wird dunkel)

- 3 mal in 0.1M PB waschen

Das Reaktionsprodukt ist nun schwarz und stabil, es kann jetzt für einige Tage aufbewahrt werden, um anschließend eine Immunzytochemie durchzuführen.

Entwässern und Eindeckeln von TMB-reagiertem Material

Beachte: Das TMB-Reaktionsprodukt ist sehr labil in Alkohol, alle Schritte dürfen daher nur kurz und bei 4°C erfolgen!

Große Wanne mit Eis füllen, die Alkoholreihe einstellen und warten, bis die Alkohole auf 4-8°C abgekühlt sind.

Objektträger in Glasschaukeln stellen und durch die Alkoholreihe hochführen:

- kurz in a.dest.

- 70% Alkohol 40 sec.

- 2 mal 90%Alkohol je 40 sec.

- 2 mal 100% Alkohol je 40 sec.

- 2 mal Xylol je 10 min

- mit Depex oder Eukitt eindeckeln

Doppelmarkierungen mit Immunfluoreszenz:

Ziege anti-Choleratoxin (CTb) und Hase anti-Substanz P (SP)

(Ziege anti-Choleragenoid = List Biochemical Laboratories, 703)

(Hase anti-Substanz P = Zymed)

1.Tag:

Waschen:

2 x 0.1 M PBS pH 7.4 je 10 min

Präinkubation:

5% Normal Esel Serum + 0.3% Triton in 0.1 M PBS pH 7.4 1h bei RT
[250µl NDS + 5 ml (0.3% Triton in PBS)]

1. Antikörpercocktail

Ziege anti-Choleratoxin 1:5000 + Hase anti-Substanz P 1:100 1d bei RT
[0.5 µl Goat anti-CTb + 25 µl Rabbit anti-SP + 2470 µl PBS]

2. Tag:

Waschen:

3 x 0.1M PBS pH 7.4 je 10 min

2. Antikörpercocktail:

anti Ziege 1:100 (Alexa) + Esel anti rabbit 1:200 (Cy³) 2h bei RT
[20µl DAG + 10µl DAR + 1970µl PBS]

Waschen:

3 x 0.1M PBS pH 7.4 je 10 min

Ziege anti-Choleratoxin (CTb) und Maus anti-Parvalbumin (PV)

[Ziege anti-Choleraagenoid = List Biochemical Laboratories,
703 Maus anti Parvalbumin = Swant 235]

1. Tag

Waschen:

2 x 0.1 M PBS pH 7.4 je 10 min

Präinkubation:

5% Normal Esel-Serum + 0.3% Triton in 0.1 M PBS pH 7.4 1h bei RT
[250 µl Normal Esel-Serum 5 ml (0.3% Triton in PBS)]

1. Antkörpercocktail

Ziege anti-Choleratoxin 1:5000 + Maus anti-Parvalbumin 1:1000 1d bei RT
[0.5 µl Ziege anti-CTB + 2.5 µl Maus anti-PV + 2497µl PBS]

2. Tag

Waschen:

3 x 0.1 M PBS pH 7.4 je 10 min

2. Antkörpercocktail:

Esel anti-Ziege 1:100 (Alexa) + Esel anti-Maus 1:200 (Cy³) 2 h bei RT
[20 µl Esel anti-Ziege + 10 µl Esel anti-Maus + 1970 µl PBS]

Waschen:

0.1 M PBS pH 7.4 je 10 min

**Nisslfärbung für Gefrierschnitte
(aqua dest.)**

1. Färbelösung

0.5 g Kresylviolett in 100 ml aqua dest. pH 7.4

2. Entfetten:

Alkoholreihe: jeweils 5 min	70%
	90%
	96%
	100%
Xylol 2 x 10 min	
Alkoholreihe jeweils 5 min	100%
	96%
	90%
	70%
aqua dest. 5 min	
Färbelösung : 5–10 min	
2 Tropfen Eisessig in 100 ml aqua dest.:	1 min
Alkoholreihe: jeweils 5 min	70%
	90%
	96% (abwarten bis die Färbung hell genug)
	100%
Isopropanol:	2 x 5 min
Xylol:	2 x 15 min

3.Eindeckeln in DPX

Danksagung

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Prof. Dr. J. A. Büttner-Ennever für die Anregung des Themas und die Überlassung desselben. Sie hat mir ermöglicht, die Arbeit in Ihrer Forschungsgruppe durchzuführen, in der mir meine Arbeit, nicht zuletzt durch die liberale Haltung aller Mitglieder der Gruppe große Freude bereitet hat. Ich danke Ihr für Ihre uneingeschränkte Unterstützung und Ihre einzigartige menschliche Betreuung.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei Priv. Doz. rer. nat. A. Horn-Bochtler für Ihre uneingeschränkte Unterstützung und Ihren Rat bedanken.

Desweiteren danke ich ganz herzlich Dr. Andreas Eberhorn für Seine großartige Unterstützung und Seine stets aufmunternden Worte.

Weiterhin möchte ich Frau Rita Büttner für Ihre stete Hilfe und Ihre Motivation danken.

Zu großem Dank bin ich M. phil. Ahmed Messoudi verpflichtet, ohne dessen technisches Wissen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vor allem danke ich Ihm aber für Seine menschliche und freundschaftliche Begleitung, durch die ich viel gelernt habe.

Ebenso einen extragroßen Dank an Karoline Fackelmann – Dankeschön für alles !!

Zuletzt möchte ich mich bei meinem kleinen Sohn Bela bedanken, dessen Anwesenheit ich beim Schreiben dieser Arbeit sehr genossen habe.

Diese Arbeit widme ich meiner lieben Frau Chaya Nouriani, die zu dieser Arbeit einen ganz entscheidenden Teil beigetragen hat, den man leider nicht sehen kann.

Lebenslauf

Name: Andreas Nouriani
Geburtsdatum: 20.07.68
Geburtsort: Ludwigshafen/Rhein

Familienstand: verheiratet mit Chaya Nouriani
Zwei Kinder Bela und Mia

1989	Fachabitur an der Fachoberschule für Sozialwesen
1990-1993	Ausbildung zum Goldschmied
1993	Gesellenprüfung als Goldschmied
1994-1999	Studium an der Akademie der bildenden Künste München (Klasse für Schmuck und Gerät bei Prof. Otto Künzli)
2000	Diplom an der Akademie der bildenden Künste München
1997-1999	Franz-Auweg-Abendgymnasium
1999	Allgemeine Hochschulreife
1999 - 2007	Studium der Humanmedizin an der LMU München
seit Mai 2007	Assistenzarzt in der Inneren Medizin

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe; die aus fremden Quellen oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

München, den 21. Juni 2008