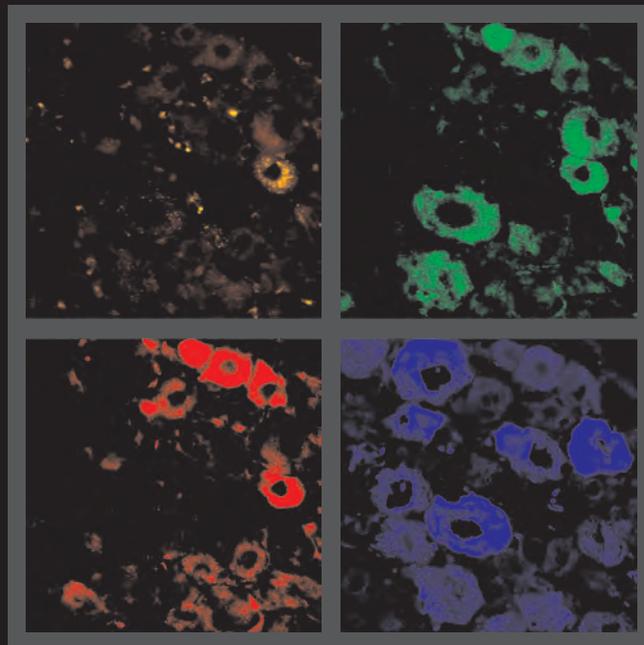


ZUR PLEURA PROJIZIERENDE SPINALGANGLIEN- NEURONE EXPRIMIEREN PH-SENSITIVE IONENKANÄLE - EINE TRACINGSTUDIE

MICHAEL GROTH



INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Zur Pleura projizierende Spinalganglienneurone
exprimieren pH-sensitive Ionenkanäle**

-

Eine Tracingstudie

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

MICHAEL GROTH

aus Vechta

Gießen 2006

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Leiterin: Prof. Dr. E. Baumgart-Vogt
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Kummer und PD Dr. Haberberger

Gutachter: PD Dr. Blaes

Tag der Disputation: 29.10.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Die Pleura	
1.1.1	Die Anatomie der Pleura	1
1.1.2	Der Flüssigkeitsaustausch der Pleura	2
1.1.3	Die Innervation der Pleura	5
1.1.4	Die Funktion der Pleura	6
1.2	Die Funktionsweise des Tracers Dil	8
1.3	Spinalganglienneurone können in verschiedene Populationen unterteilt werden	10
1.4	pH-sensitive Ionenkanäle	
1.4.1	Der Acid-sensing ion channel 3 (ASIC3)	12
1.4.1.1	Die Lokalisation von ASIC3	13
1.4.1.2	Elektrophysiologische Eigenschaften von ASIC3-Homo- und ASIC3/2b-Heterotetrameren	14
1.4.1.3	Die Rolle des ASIC3 bei der Nozizeption und Mechanotransduktion	14
1.4.2	Der Vanilloid Rezeptor 1 (TRPV1)	17
1.4.2.1	Die Lokalisation des TRPV1	18
1.4.2.2	TRPV1-Homotetramere	18
1.4.2.3	Elektrophysiologische Eigenschaften des TRPV1	21
1.4.2.4	Agonisten, Antagonisten und Modulatoren des TRPV1	22
1.4.2.5	TRPV1 als Marker polymodaler Nozizeptoren	23
1.5	Neurofilament 68 kD (NF68)	
1.5.1	Neurofilamente sind Intermediärfilamente	26
1.5.2	Aufbau und Struktur der Intermediärfilamente	26
1.5.3	Neurofilamentproteine assoziieren zu Polymeren	29
1.5.4	Neurofilamente sind eine Determinante des axonalen Durchmessers	29
1.5.5	Neurofilamente dienen der axonalen Stabilisierung	30
1.5.6	Defekte in Neurofilamentgenen können zu Erkrankungen führen	30
1.6	Ziele und Fragestellungen	32

2 Material und Methoden

2.1	Versuchstiere	33
2.2	Tracerapplikation in den Pleuraspalt	33
2.3	Tracerapplikation in die Interkostalmuskulatur	34
2.4	Präparation und Perfusionsfixierung der Gewebe	34
2.5	Anfertigung der Gewebeschnitte	36
2.6	Immunfluoreszenz und Histochemie	36
2.7	Auswertung	38
2.8	Zusammenfassung	40

3 Ergebnisse

3.1	Verteilung des Tracerfarbstoffes nach pleuraler Applikation	
3.1.1	Tracerverteilung am Applikationsort	41
3.1.2	Tracerverteilung in applikationsfernen Organen	45
3.1.3	Dil-positive Neurone in den Ganglia jugulare et nodosum	49
3.1.4	Segmentale Verteilung des Tracers in DRG-Neuronen	49
3.1.5	Perikaryondurchmesser der ipsilateralen DRG-Neurone zwischen Th3-Th6	53
3.2	Tracerapplikation in den 6. Interkostalmuskel	
3.2.1	Verteilung des Tracers	54
3.2.2	Dil-positive Neurone in den Ganglia jugulare et nodosum	56
3.2.3	Segmentale Verteilung des Tracers in DRG-Neuronen	56
3.3	Neurochemische Charakteristika Dil-positiver pleuraler DRG-Neurone	
3.3.1	Anteil von immunhistochemisch definierten Subpopulationen Dil-markierter DRG-Neurone	58
3.3.2	Perikaryondurchmesser von Dil-positiven und TRPV1-, ASIC3- sowie ASIC3/TRPV1-immunreaktiven Neuronen	62
3.3.3	Perikaryondurchmesser von Dil-positiven und ASIC3- bzw. ASIC3/NF68-immunreaktiven Neuronen	63
3.3.4	Statistische Analyse auf Unterschiede zwischen den Neuronsubpopulationen <35 µm und >35 µm	64
3.3.5	Statistische Analyse auf Unterschiede der Neuronsubpopulationen bzgl. NF68-Immunreaktivität	65

4	Diskussion	
4.1	Retrograd-neuronales Tracing	
4.1.1	Die Interkostalmuskulatur wird segmental durch DRG-Neurone innerviert	66
4.1.2	Die Clearance des Tracers aus dem Pleuraspalt	66
4.1.3	Dil-markierte DRG-Neurone entsenden pleurale Afferenzen	69
4.2	Pleurale Afferenzen besitzen verschiedene Charakteristika	
4.2.1	Einteilung in $A\alpha/\beta > A\delta$ -, $A\delta > A\alpha/\beta$ - und C-Fasern	72
4.2.2	Pleurale Afferenzen können in ASIC3-, TRPV1- und ASIC3/TRPV1-positive Neuronsubpopulationen unterteilt werden	73
4.2.3	Mögliche Funktionen verschiedener Neuronsubpopulationen pleuraler Afferenzen	75
4.2.4	Vergleich der erhobenen Ergebnisse mit bisherigen Veröffentlichungen	77
4.3	Kritische Betrachtung des Versuchsaufbaus	79
4.4	Ausblick auf eine mögliche Bedeutung von pleuralen Afferenzen unter klinisch-therapeutischen Gesichtspunkten	80
5	Zusammenfassung	82
6	Anhang	84
7	Literatur	90
8	Danksagung	103
9	Lebenslauf	104

Abkürzungsverzeichnis:

Ab	Absorptionsmaximum
AF	Anregungsfilter
AMCA	Aminomethyl-Coumarin-Acetat
AS	Aminosäure
ASIC	Acid-sensing ion channel
BSA	bovine serum albumine (Rinderserum)
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II
Cy5	Indodicarbocyanin
Dil	DilC ₁₆ (3) (1,1'-dihexadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat)
DRG	dorsal root ganglion (Spinalganglion)
E	Epithel
EK	Einstichkanal
Em	Emissionsmaximum
ENaC	epithelialer Natriumkanal
FF	Fluoreszenzfarbstoff
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMRF	Phe-Met-Arg-Phe
Ggl.	Ganglion
gS	graue Substanz
HEK	human embryonic kidney-derived (von einer humanen, embryonalen Niere abstammend)
ICM	Interkostalmuskel
ICR	Interkostalraum
Ig	Immunglobulin
IM	Intermediärfilament
KG	Körpergewicht
Lnn.	Nodi lymphatici
LP	Lungenparenchym
M.	Musculus
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein

Mu	Muscularis
My	Myokard
N.	Nervus
NF	Neurofilament
NF-H	Neurofilament heavy (bei der Ratte 200 kD)
NF-L	Neurofilament low (bei der Ratte 68 kD)
NF-M	Neurofilament medium (bei der Ratte 160 kD)
NPFF	Neuropeptid FF
NPSF	Neuropeptid SF
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs (nichtsteroidale Antiphlogistika)
NSS	Normales Schweineserum
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBS+S	PBS-Puffer mit doppelter Salzkonzentration
PEEP	positive endexpiratory pressure (positiv endexpiratorischer Druck)
PIP ₂	Phosphatidyl-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PP	Pleura parietalis
pre-TM1	prä-transmembranäre Domäne 1
RECA1	rat endothelial cell antigen 1
SHK	Sequenzhomologiekategorie
SM	Submukosa
SF	Sperrfilter
TM	transmembranäre Domäne
TRP	transient receptor potential
TRPV1	transient receptor potential vanilloid receptor 1
wS	weiße Substanz

1 Einleitung

1.1 Die Pleura

1.1.1 Die Anatomie der Pleura

Die rechte und linke Lunge befinden sich jeweils in einem als Brustfellhöhle oder Pleurahöhle, *Cavitas pleuralis*, bezeichnetem Hohlraum. Bis auf die Bereiche, in denen die Pleurahöhlenwände direkt aneinander liegen, füllen die Lungen diese beiden Höhlen komplett aus. Die Pleurahöhle wird auch als seröse Höhle bezeichnet und von einer serösen Haut, der Pleura, ausgekleidet. Als *Pleura visceralis* wird der Teil der Pleura bezeichnet, welcher der Lunge direkt anliegt. Der restliche Anteil, welcher nur durch den Pleuraspalt von der *Pleura visceralis* getrennt wird und am Lungenhilum in diese übergeht, heißt *Pleura parietalis* (Brustfell, Rippenfell). Die *Pleura parietalis* wird in die *Pleura costalis*, *mediastinalis* und *diaphragmatica* unterteilt (Leonhardt, 1987; Duncker, 1994).

Mikroskopisch besteht die Pleura aus einer einschichtigen Mesothelzellschicht, die einer Basallamina aufliegt. Unter dieser Basallamina befindet sich zunächst eine Schicht mit elastischen Fasern, auf die lockeres Bindegewebe und schließlich eine tiefe fibro-elastische Schicht folgen. Pleurale Nerven, Blut- und Lymphgefäße sind in der Schicht aus lockerem Bindegewebe lokalisiert (Antony, 2003). Die tiefe fibro-elastische Schicht der *Pleura costalis* grenzt an die *Fascia endothoracica*. Untersuchungen am Schaf konnten zeigen, dass diese Faszie, welche durch Septen mit der Faszie der Interkostalmuskulatur in Verbindung steht, zur Pleura ziehende Blut- und Lymphgefäße enthält (Albertine et al., 1984).

Die submesothelialen Kapillaren der parietalen Pleura werden von der systemischen Zirkulation versorgt. Kapillaren der viszeralen Pleura erhalten ihre Blutversorgung über die Pulmonalarterien oder die Bronchialarterien. Hier scheinen zwischen verschiedenen Spezies Unterschiede zu bestehen: So erfolgt die Blutversorgung bei Spezies mit dünner (~15-35 µm) viszeraler Pleura (Hund, Katze, Kaninchen) hauptsächlich über die Pulmonalarterien, bei Spezies mit dicker (~15-86 µm) viszeraler Pleura (Mensch, Schaf, Schwein) größtenteils über die Bronchialarterien (Jones, 2002; Zocchi, 2002).

Bei Nagetieren wird das Mesothel der parietalen Pleura durch interzelluläre Poren in seiner Kontinuität unterbrochen. An Stellen, wo sich Anteile der *Pleura parietalis* und des Perikards (*Lamina parietalis pericardii*) berühren, stehen diese Poren teilweise

mit perikardialen Interzellularporen in Verbindung. Hierdurch besteht eine Verbindung zwischen der Perikardhöhle und den beiden Pleurahöhlen. Beide Pleurahöhlen können also indirekt über die Perikardhöhle miteinander kommunizieren (Nakatani et al., 1988). Zusätzlich bestehen bei der Ratte zwischen den retrokardialen, mediastinalen Pleuraabschnitten auch direkte Verbindungen der beiden Pleurahöhlen durch Fenestrationen (Mixer, 1941).

Darüber hinaus besitzt das Mesothel der parietalen Pleura sog. Stomata (Abb. 1). Diese Stomata haben Anschluss an das feinmaschige pleurale Lymphgefäßnetz (Mariassy et Wheeldon, 1983; Albertine et al., 1984; Jones, 2002; Zocchi, 2002). Von hier fließt die Lymphe in ein grobmaschiges subpleurales Netz ab, aus welchem Lymphgefäße hervorgehen, die den Interkostalgefäßen und Nerven entlang dem unteren Rippenrand folgen. Diese Lymphgefäße drainieren die Lymphe der Pleura und der Interkostalmuskulatur in die jeweils regionalen Nodi lymphatici (Lnn.). Die regionalen Lnn. der Pleura costalis münden in die Lnn. parasternales et intercostales, die der Pleura mediastinalis in die Lnn. intercostales et parasternales und die der Pleura diaphragmatica sowohl in thorakale als auch retroperitoneale Lnn. (Leonhardt, 1987; Kubik, 1993).

Lymphgefäße der viszeralen Pleura gelangen beim Schaf über das Lungenhilum zu ihren regionalen Lnn.. Am Lungenhilum anastomosieren sie mit intrapulmonalen Lymphgefäßen (Albertine et al., 1982). Das Lymphsystem der Pleura viszeralis soll nur zu einem sehr geringen Anteil an der pleuralen Lymphdrainage beteiligt sein (Albertine et al., 1984).

Zu dem pleuralen Lymphsystem des Menschen liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor.

1.1.2 Der Flüssigkeitsaustausch der Pleura

Beim Menschen beträgt das Volumen der Pleuraflüssigkeit beider Pleurahöhlen unter physiologischen Bedingungen $0,26 \pm 0,1$ ml/kg (Noppen et al., 2000). Damit die Pleuraflüssigkeit ihre Funktion als Gleitmittel (s. 1.1.4) zwischen den beiden Pleurablättern aufrechterhalten kann, muss sie einen niedrigen kolloidosmotischen Druck aufweisen, welcher für ein niedriges Flüssigkeitsvolumen notwendig ist (Zocchi, 2002). Die Mechanismen, welche am pleuralen Flüssigkeitsaustausch und seiner Zusammensetzung beteiligt sein könnten, sind in Abb. 1 dargestellt und werden im Folgenden diskutiert. Vorweggenommen soll angemerkt werden, dass

mehrere Untersuchungen zeigen konnten, dass die Pleura parietalis, bedingt durch ihre Struktur (s. 1.1.1), eine größere Permeabilität und ein größeres Absorptionsvermögen für Flüssigkeiten und Partikel besitzt als die Pleura visceralis (Shinohara, 1997).

Das Volumen der Pleuraflüssigkeit resultiert aus einem Flüssigkeitsein- und ausstrom, welcher durch Starling-Kräfte (hydrostatischer und onkotischer Druck), lymphatische Drainage und Elektrolyt-gekoppelte Flüssigkeitsabsorption getragen wird (Zocchi, 2002).

So sind Starling-Kräfte für eine Flüssigkeitsfiltration aus Gefäßen der parietalen Pleura durch interzelluläre Poren der Pleura parietalis verantwortlich. Die Filtrationsrate nimmt hierbei mit der Tiergröße zu (Miserocchi, 1997; Zocchi, 2002). Darüber hinaus ist die Filtrationsrate auch von der Ventilation abhängig: Durch ventilationsbedingte Beanspruchung der Pleura nimmt ihre Permeabilität zu. Die Pleura viszeralis ist für eine Flüssigkeitsabsorption in pulmonale Kapillaren verantwortlich, welche ebenfalls durch Starling-Kräfte getragen wird (Zocchi, 2002).

Im Gegensatz zur Pleura visceralis besitzt die Pleura parietalis sog. Lymphstomata (s. 1.1.1). Diese strukturelle Besonderheit gemeinsam mit Versuchen unter Verwendung unterschiedlicher Tracersubstanzen lassen verschiedene Autoren zu dem Ergebnis kommen, dass die Stomata der parietalen Pleura zu einem großen Teil für die Clearance von großen Partikeln und Zellen aus der Pleuraflüssigkeit verantwortlich sind (Wang, 1975; Albertine et al., 1984; Shinohara, 1997). Es ist noch nicht genau bekannt, welchen Anteil die Lymphdrainage durch die parietale Pleura am Flüssigkeitsausstrom ausmacht. Unter pathophysiologischen Bedingungen mit erhöhtem Volumen der Pleuraflüssigkeit kann die Drainagerate aber um das 20- bis 30-fache gesteigert werden (Shinohara, 1997). Aufrechterhalten wird die pleurale Lymphdrainage vermutlich durch Pumpbewegungen, die auf die Lymphgefäße wirken und somit einen Sog erzeugen, der unter dem des Pleuraspaltes liegt. Diese Pumpbewegungen könnten durch die Kontraktion der glatten Lymphgefäßmuskulatur und der Interkostalmuskulatur bei der Respiration sowie durch kardiale Oszillationen verursacht werden (Negrini et al., 1994; Negrini et Del Fabbro, 1999; Zocchi, 2002). Zwei weitere Mechanismen könnten darüber hinaus zu einer pleuralen Flüssigkeitsabsorption beitragen: Zum einen weisen Untersuchungen von Zocchi et al. an Kaninchen darauf hin, dass Elektrolyttransporter an der pleuralen Flüssigkeitsabsorption beteiligt sind (Zocchi et al., 1991). Zum anderen postulierten

Agostoni et al. auf Grund ihrer Versuche an Kaninchen mit einem Transzytose-Inhibitor, dass die Transzytose durch Pleuramesothelzellen Proteine und Flüssigkeiten aus dem Pleuraspalt entfernen kann (Agostoni et al., 2002).

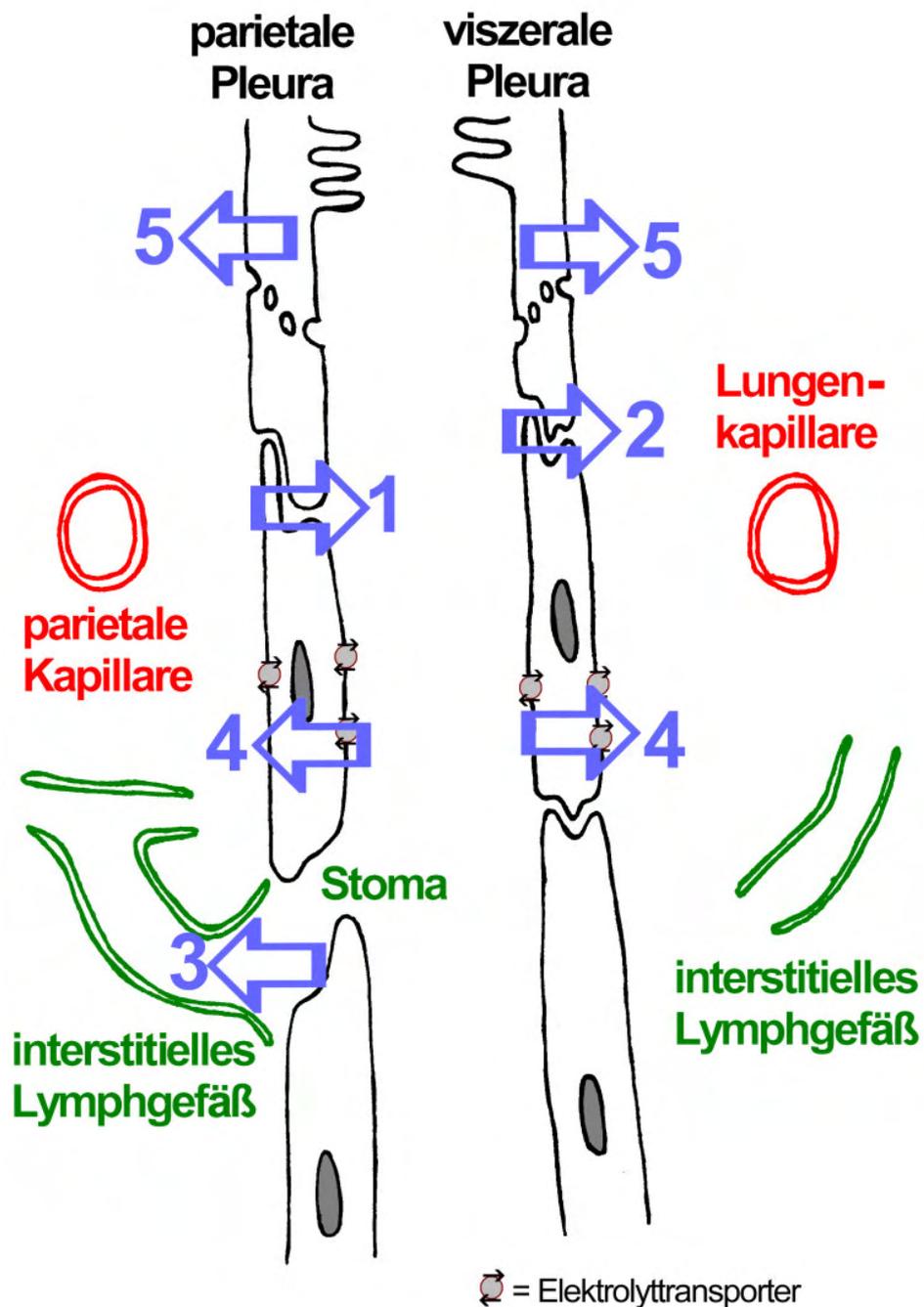


Abb. 1: Transpleuraler Flüssigkeitsaustausch in Anlehnung an Zocchi, 2002. Im oberen Bildabschnitt sind exemplarisch zwei Mesothelzellen mit Mikrovilli dargestellt. Folgende Mechanismen werden postuliert am transpleuralen Flüssigkeitsaustausch teilzunehmen: 1: Filtration von Makro- und Mikromolekülen durch Poren, welche vermutlich aus interzellulären Lücken bestehen. 2: Absorption. 3: Direkte Drainage durch Lymphstomata, welche Anschluss an das subpleurale Lymphgefäßsystem der parietalen Pleura besitzen. 4: An Elektrolyttransporter gekoppelter Flüssigkeitsausstrom. 5: Transzytose.

1.1.3 Die Innervation der Pleura

Nur wenige Arbeiten haben sich in der Vergangenheit mit der Innervation der Pleura beschäftigt. Sowohl die viszerale als auch die parietale Pleura werden afferent versorgt, jedoch nur Afferenzen der Pleura parietalis führen sensible, nozizeptive Fasern (Ingram, 1987).

Der kostale Anteil der Pleura parietalis wird segmental durch Interkostalnerven sensibel versorgt, wohingegen die Pleura mediastinalis und diaphragmatica durch den N. phrenicus afferent innerviert werden (Duncker, 1994). Darüber hinaus werden die Blutgefäße der Pleura visceralis und parietalis sowohl durch adrenerge als auch durch cholinerge Nerven versorgt (Khaisman, 1975a,b; Motavkin et al., 1997).

Die meisten Erkenntnisse über die Innervation beruhen auf klinischen Beobachtungen. So konnten beispielsweise Mozell et al. zeigen, dass eine extrapleurale Nervenblockade der Interkostalnerven mit einem Anästhetikum zu einer Reduzierung in der Schmerzwahrnehmung nach Pleurektomie führt (Mozell et al., 1991). Dieses steht im Einklang mit einer sensiblen Innervation der Pleura durch Interkostalnerven.

Die Veröffentlichungen von Wedekind (1997) und Jammes et al. (2005) haben sich erstmals mit den elektrophysiologischen Eigenschaften pleuraler Afferenzen des N. phrenicus und der Interkostalnerven beschäftigt.

Wedekind gelang es, die Aktivität einzelner pleuraler Nervenfasern des Kaninchens zu messen. Hierzu wurden an einem Pleurapräparat mit erhaltenem N. phrenicus einzelne rezeptive Felder der Pleura mediastinalis und diaphragmatica mit Hilfe mechanischer Stimulation identifiziert. Auf Grund der Nervenleitungsgeschwindigkeiten konnte er Nervenfasern der Gruppen III und IV nach Lloyd und Hunt identifizieren, welche A δ - und C-Fasern nach Erlanger und Gasser entsprechen (s. 1.3). 82 % der untersuchten Fasern konnten durch eine Mixtur aus den proinflammatorischen Mediatoren Bradykinin, Serotonin, Histamin und Prostaglandin E₂ stimuliert werden. Ein kleinerer Anteil der Nervenfasern reagierte auch auf Hitze, Kälte, niedrigen pH (6,1) und Capsaicin. Die untersuchten Nervenfasern waren polymodal und besaßen gleichzeitig mechanotransduktive Eigenschaften (Wedekind, 1997).

Um die Aktivität pleuraler Afferenzen der Interkostalnerven zu messen, entfernten Jammes et al. an anästhesierten Kaninchen die Interkostalmuskulatur eines Interkostalraumes (ICR). An der nun freigelegten Pleura parietalis und dem

entsprechenden Interkostalnerven führte diese Arbeitsgruppe verschiedene elektrophysiologische Experimente durch. So konnten die untersuchten pleuralen Afferenzen auf Grund ihrer Nervenleitungsgeschwindigkeit Nervenfasern der Gruppen III und IV (entsprechend A δ - und C-Fasern nach Erlanger und Gasser) zugeordnet werden. 97 % dieser Nervenfasern zeigten Stimulation durch mechanische Reize. Von diesen mechanotransduktiven Nervenfasern wiesen 70 % polymodale Eigenschaften auf und reagierten auf chemische Reizung durch verschiedene Irritantien: 49 % konnten durch Laktat aktiviert werden und 50 % durch eine Mixtur aus inflammatorischen Mediatoren. 57 % der mechanotransduktiven Fasern zeigten darüber hinaus eine Aktivitätsänderung durch die Applikation von Capsaicin (Jammes et al., 2005).

Pleuraschmerzen werden als gut lokalisierbar und stechend auf dem oberflächlichen Innervationsgebiet des entsprechenden Interkostalnervs empfunden. Auf Grund der Innervation durch Interkostalnerven und den N. phrenicus können Pleuraschmerzen auch auf das obere Abdomen oder die Schulter projizieren (Ingram, 1987). Überwiegend sind Prozesse, die sich im pleuranahen Lungenparenchym abspielen, für Pleuraschmerzen verantwortlich. Akut entzündliche lobäre oder herdförmige Erkrankungen, einschließlich des Lungenabszesses und der Lungengangrän, sowie chronische Entzündungen und die Lungentuberkulose können neben malignen Erkrankungen eine Pleuritis sicca hervorrufen. Diese verursacht einen stechenden, gut lokalisierbaren, durch Pleurareiben hervorgerufenen Schmerz. Da jeder Verschluss eines Pulmonalarterienastes ein Gebiet betrifft, das irgendwo die Lungenoberfläche und damit die Pleura erreicht, ist hierbei eine begleitende Pleuritis obligatorisch (Kleinsorg et Finke, 1989).

1.1.4 Die Funktion der Pleura

Die Aufgabe der Pleura besteht in der Kopplung von Lunge und Brustkorb. Sie bildet durch die Pleuraflüssigkeit und die mit Hyaluronsäure-reichen Glykoproteinen ausgestatteten Mikrovilli der Mesothelzellen beider Pleurablätter eine gleitende Verschiebeschicht für die Lungenbewegungen während der Respiration (Jones, 2002; Zocchi, 2002). Außerdem fixiert die Pleuraflüssigkeit die Lunge adhäsiv an der Wand der Pleurahöhle und wirkt so einem Lungenkollaps entgegen. Da Flüssigkeit nicht dehnbar ist, entsteht auf diese Weise eine Kopplung zwischen der Lunge und

der zur Respiration erforderlichen Atemmuskulatur des Brustkorbes (Duncker, 1994; Scheid, 2001).

Darüber hinaus sind Pleuramesothelzellen in der Lage aktiv und passiv an inflammatorischen Prozessen teilzunehmen, indem sie Teilchen und Bakterien phagozytieren sowie Zytokine mit teilweise chemotaktischen Eigenschaften produzieren können (Antony, 2003).

1.2 Die Funktionsweise des Tracers Dil

Der in dieser Arbeit zur retrograden Markierung von DRG-Neuronen verwendete Tracer DilC₁₆(3) (1,1'-Dihexadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat, Dil) ist ein lipophiler Markierungsstoff, welcher auf Grund seiner Struktur in die Lipiddoppelmembran von Zellen integriert wird (Abb. 2). Die Lipiddoppelmembran unterliegt einem ständigen Erneuerungs- und Recyclingprozesses. Innerhalb dieses Prozesses kommt es zur zytoplasmatischen Abknospung von Vesikeln aus der Lipiddoppelmembran, welche Tracermoleküle enthalten. Diese Dil-markierten Vesikel können in Nervenzellen via aktivem axonalen Transport bis ins Perikaryon transportiert werden (Mukherjee et al., 1999; Maxfield et McGraw, 2004). Durch die Tracerhaltigen Vesikel erscheinen Dil-markierte Neurone teilweise granuliert (Abb. 3). Der retrograde-axonale Transport der Vesikel beeinflusst die physiologischen Zellvorgänge nicht (Honig et Hume, 1986).

Neben diesem schnellen, axonalen Transport kann der Tracer sich auch durch Lateraldiffusion innerhalb der Lipiddoppelmembran bis zum Perikaryon ausbreiten (Molecular Probes: Product information, 2005).

Die erstgenannte Methode der retrograden Markierung mit dem lipophilen Tracer Dil erfordert energieabhängige Prozesse und funktioniert deshalb nur an lebendem Gewebe. Die passive Lateraldiffusion des Tracers gelingt auch an bereits fixiertem Gewebe (Molecular Probes: Product information, 2005).

In dieser Arbeit wurde der Tracer Dil lebenden Ratten intraoperativ in einen Interkostalmuskel (ICM) oder in den Pleuraspalt appliziert. Es wurde also v.a. der aktive retrograde axonale Transport ausgenutzt. Innerhalb von sechs Tagen wurde der Tracer so in die Perikarya von pseudounipolaren Nervenzellen oder auch, wie im Falle der Injektion in den ICM, von α -Motorneuronen transportiert.

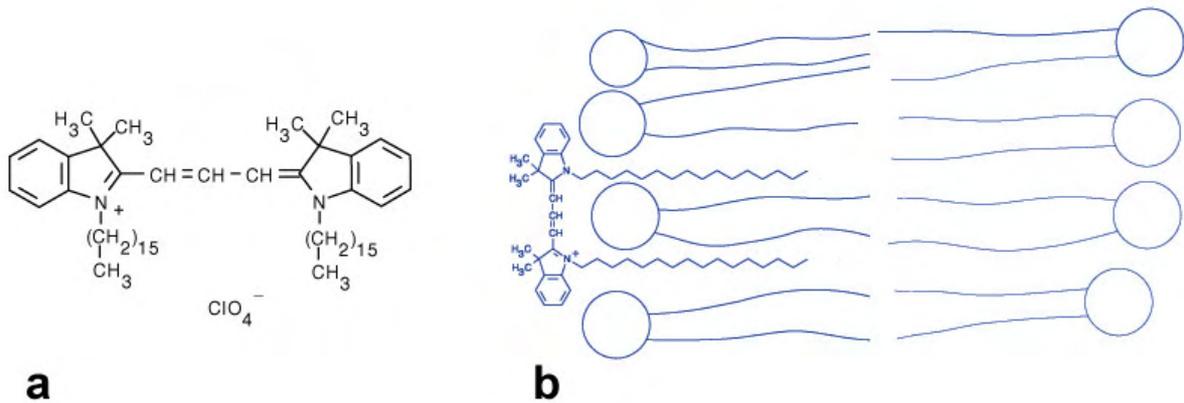


Abb. 2: Strukturformel des lipophilen Tracers Dil (a). Auf Grund seiner amphipatischen Struktur kann der Tracer in die Lipiddoppelmembran von Zellen integriert werden (b). Aus: Molecular Probes: The Handbook, 2006.

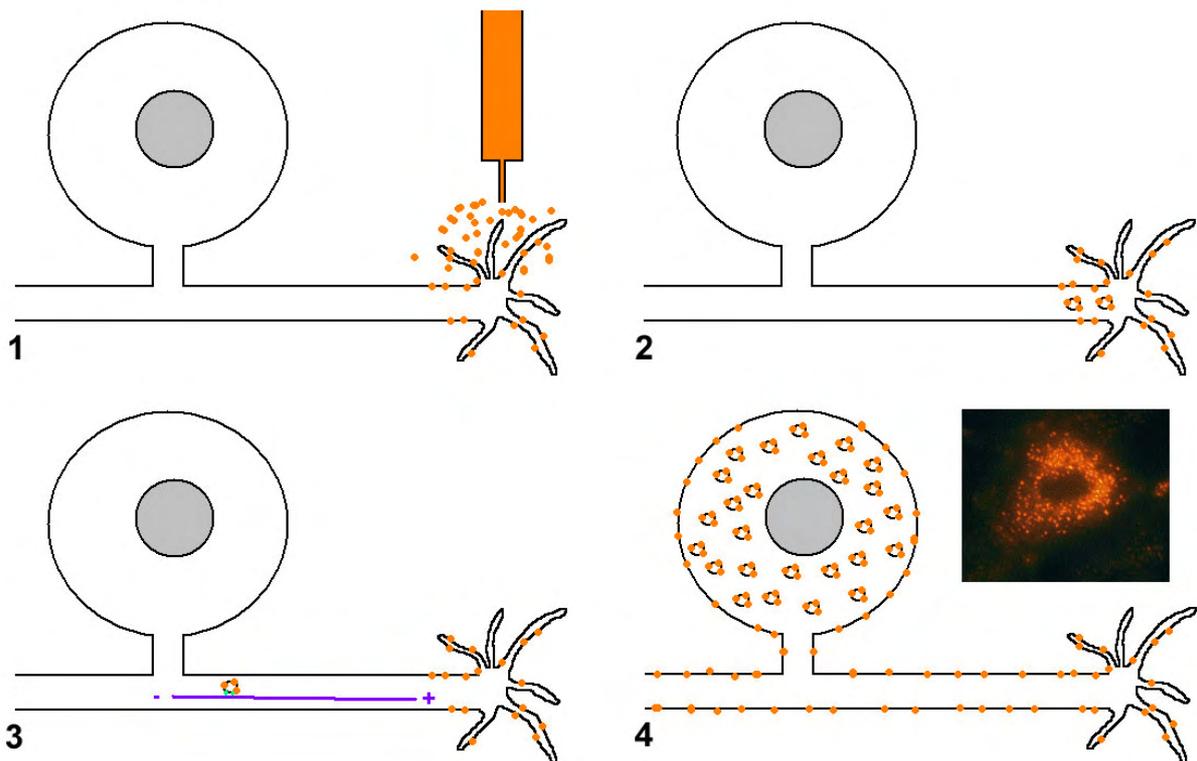


Abb. 3: Retrogrades Tracing. 1: Der Tracer Dil wird in ein Gewebe appliziert und integriert sich auf Grund seiner Struktur in die Lipiddoppelmembran von Nerven terminalen. 2: Von der Lipiddoppelmembran sprießen im Zuge von Erneuerungs- und Recycling-Prozessen Endosomen ab. 3: Diese Endosomen gelangen als Retrosomen durch aktiven retrograden Transport zum Perikaryon. 4: Hierdurch werden im Perikaryon viele Dil-haltige Vesikel angereichert, wodurch das Perikaryon unter dem Fluoreszenzmikroskop granuliert erscheint (s. Bildeinlage). Der Tracer breitet sich darüber hinaus durch Lateraldiffusion in der Lipiddoppelmembran aus und erreicht auch auf diese Weise das Perikaryon. Dieser Prozess dauert jedoch länger als der aktive axonale Transport.

1.3 Spinalganglienneurone können in verschiedene Populationen unterteilt werden

Die amerikanischen Physiologen Herbert Spencer Gasser und Joseph Erlanger erhielten für ihre Forschungen über die Funktionen der Nervenfasern 1944 gemeinsam den Nobelpreis für Medizin. Sie begründeten eine Klassifikation der Nervenfasern in A-, B- und C-Fasern auf Grund unterschiedlicher Nervenleitungsgeschwindigkeiten. Die A-Fasern lassen sich darüber hinaus noch in $A\alpha$ -, $A\beta$ -, $A\gamma$ - und $A\delta$ -Fasern unterteilen (Gasser, 1945; Klinke, 2001). Spinalganglien- (dorsal root ganglia, DRG) Neurone entsenden ausschließlich somato- und viszerosensible $A\alpha$ -, $A\beta$ -, $A\delta$ - und C-Fasern, wobei der Anteil nozizeptiver Neurone in der Reihenfolge $C > A\delta > A\alpha/\beta$ abnimmt (Lawson, 2002).

Untersuchungen an DRG-Neuronen konnten zeigen, dass der Neurondurchmesser in gewisser Weise mit der Nervenleitungsgeschwindigkeit des peripheren Axons korreliert. So konnten Lee et al. herausfinden, dass bei der Katze DRG-Neurone mit einem Perikaryondurchmesser $>50 \mu\text{m}$ stets eine Leitungsgeschwindigkeit $>2,5 \text{ m/s}$ besitzen (A-Fasern). Neurone mit einem Durchmesser $<35 \mu\text{m}$ leiten stets mit einer Leitungsgeschwindigkeit, die geringer als $2,5 \text{ m/s}$ ist (C-Fasern). Neurone zwischen 35 und $50 \mu\text{m}$ im Durchmesser können hingegen keiner eindeutigen Leitungsgeschwindigkeit zugeordnet werden (Lee et al., 1986).

Lawson et Waddel führten ähnliche Versuche an DRG-Neuronen der Ratte durch. Sie teilten die Neurone auf Grund ihrer Leitungsgeschwindigkeiten in folgende Populationen ein: C-, C/ $A\delta$ -, $A\delta$ - und $A\alpha/\beta$ -Neurone. Für diese Populationen ermittelten sie folgende Durchschnittswerte für den Perikaryondurchmesser (in μm): $17,8 \pm 10,8$ (C-Neurone), $21,1 \pm 12,5$ (C/ $A\delta$ -Neurone), $23,8 \pm 16,5$ ($A\delta$ -Neurone), $33,4 \pm 15,8$ ($A\alpha/\beta$ -Neurone). Die getesteten Neurone wurden anschließend auf ihre Immunreaktivität bzgl. eines Antikörpers gegen ein Neurofilament (NF) als Marker myelinisierter Neurone untersucht. Hierbei zeigten sich alle C-Neurone NF negativ, alle $A\delta$ - sowie $A\alpha/\delta$ -Neurone NF positiv. Die C/ $A\delta$ -Neurone präsentierten hingegen keine einheitliche Immunreaktivität. Lawson et Waddel wiesen in ihrer Veröffentlichung jedoch darauf hin, dass bei ihren Untersuchungen alle Perikaryondurchmesserbestimmungen an in Paraffinwachs eingebetteten Geweben erfolgten. Gegenüber schockgefrorenen Neuronen weisen in Paraffinwachs eingebettete Neurone einen etwas geringeren Perikaryondurchmesser auf (Lawson et Waddell, 1991).

Neben dem Perikaryondurchmesser und dem Gehalt an NF können DRG-Neurone auch durch ihre Expression des Ionenkanals *transient receptor potential vanilloid receptor 1* (TRPV1) (s. 1.4.2) charakterisiert werden. TRPV1 kommt überwiegend in kleinen DRG-Neuronen vor, welche hauptsächlich unmyelinisierte C-Fasern entsenden, und gilt als klassischer Marker nozizeptiver Neurone (Tominaga et Julius, 2000). Tab. 1 fasst die dargestellten Charakteristika verschiedener DRG-Neuron-Populationen zusammen.

	Faserqualität	Perikaryondurchmesser (in μm)	Neurofilament (NF)
	A α / β	33,4 \pm 15,8	positiv
	A δ	23,8 \pm 16,5	positiv
	C	17,8 \pm 10,8	negativ

Tab. 1: Charakteristika verschiedener DRG-Neuron-Populationen. Nozizeptive Neurone besitzen zu einem großen Teil C-Faserqualität. Ihr Anteil nimmt in der Reihenfolge C>A δ >A α / β ab. Umgekehrt verhält es sich für die nicht-nozizeptiven Mechanorezeptoren. NF-positive Neurone sind myelinisiert und besitzen A-Faserqualität. Die Angaben gelten für in Paraffinwachs eingebettete Neurone der Ratte (Lawson et Waddell, 1991).

1.4 pH-sensitive Ionenkanäle

1.4.1 Der Acid-sensing ion channel 3 (ASIC3)

Acid-sensing ion channels (ASIC) sind Ionenkanäle, die wie die epithelialen Natriumkanäle (ENaC) zur Familie der Degenerine gehören, und sich wie diese durch das Diuretikum Amilorid hemmen lassen (Kellenberger et Schild, 2002). Der Name Degenerin leitet sich von der Entdeckung mechanosensibler Ionenkanäle bei dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* her. Diese Ionenkanäle besitzen hohe Sequenzhomologie zu den bei Säugetieren vorkommenden ENaCs und ASICs. Mutationen in den Degenerin-Genen von *C. elegans* führen zur Zellschwellung durch gesteigerte Ionenpermeabilität (Driscoll et Chalfie, 1991; Hong et Driscoll, 1994). Zellen mit diesen Mutationen weisen also einen *degenerativen* Zellphänotyp auf. Weitere Ionenkanäle, welche eine hohe Sequenzhomologie zu den bisher genannten Kanälen aufweisen und ebenfalls zu der Degenerinfamilie zählen, sind die FMRFamid- (Phe-Met-Arg-Phe-amid-) Kanäle der Schnecke *Helix aspersa*. FMRFamide können direkt Ionenkanäle in Neuronen von *H. aspersa* aktivieren und somit zu einer Depolarisation führen (Green et al., 1994).

ASICs bestehen aus vier Untereinheiten (Abb. 4). Bisher sind sechs verschiedene Untereinheiten bekannt, welche zu Homo- und Heterotetrameren assoziieren können: ASIC1a+b, ASIC2a+b, ASIC3 und ASIC4 (Krishtal, 2003). ASIC1a+b sowie ASIC2a+b stellen Splicevarianten dar (Waldmann et Lazdunski, 1998).

Wenn in dieser Arbeit die Abkürzung *ASIC* ohne eine Zahlenbezeichnung verwendet wird, so bezeichnet diese einen hetero- oder homomeren Ionenkanal, der aus vier Untereinheiten aufgebaut ist. Die Abkürzungen *ASIC1a+b*, *ASIC2a+b*, *ASIC3* und *ASIC4* benennen hingegen jeweils die verschiedenen Untereinheiten.

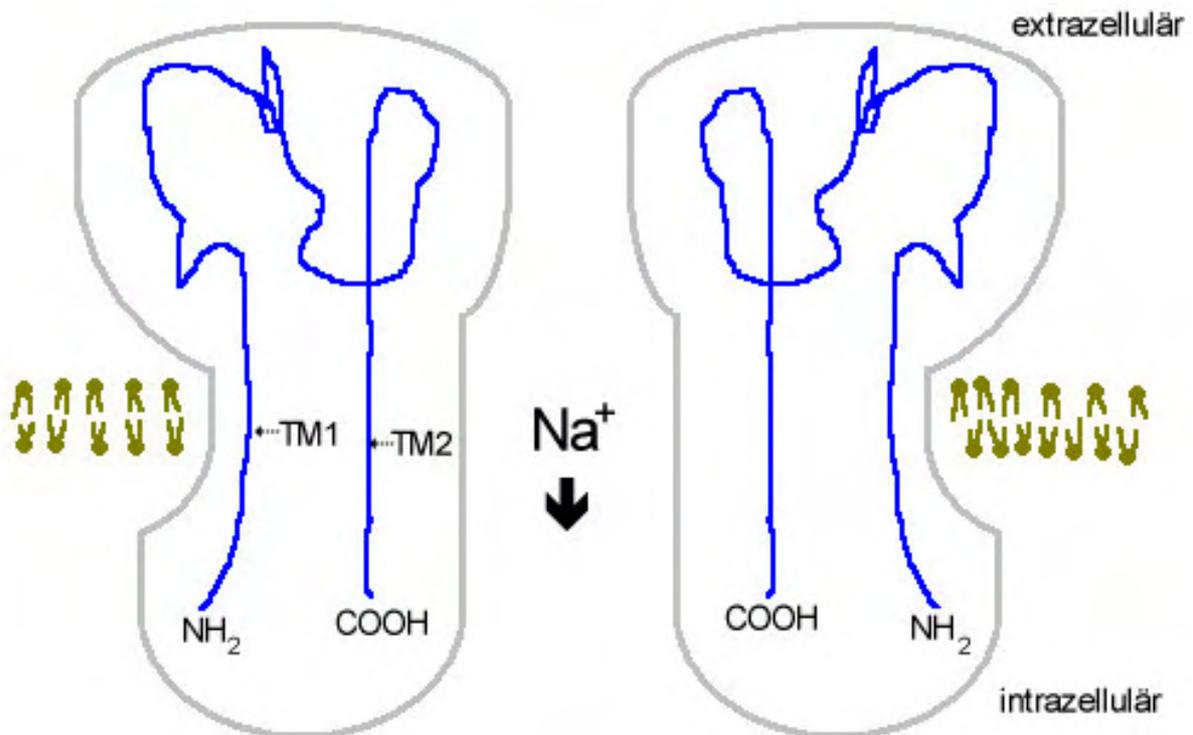


Abb. 4: ASIC im Querschnitt in Anlehnung an Krishtal, 2003. Der Ionenkanal besteht aus vier Untereinheiten. Der transmembranäre Anteil besteht aus zwei Domänen: TM1 und TM2. Die intrazelluläre Region vor TM1 (pre-TM1) scheint die Permeabilität für bestimmte Ionen zu beeinflussen.

1.4.1.1 Die Lokalisation von ASIC3

Waldmann et al. gelang es 1997 einen pH-sensitiven, in DRG-Neuronen vorkommenden Natriumkanal zu klonieren, welcher einen biphasischen Stromfluss aufwies (Waldmann et al., 1997). Dieser Ionenkanal wurde *dorsal root ASIC* (DRASIC) genannt und ist identisch mit ASIC3-Homotetrameren (Krishtal, 2003). Neben seiner Lokalisation in mittleren und großen DRG-Neuronen (de la Rossa et al., 2002) kann ASIC3 immunhistochemisch auch in neuronalen Strukturen der Meissner-Tastkörperchen sowie des Haarfollikels, in freien epidermalen Nervenendigungen (Price et al. 2001), in Strukturen des Innenohres wie den Haarzellen des Corti-Organs (Hildebrand et al., 2004), in Nervenfasern, welche die Gefäße quergestreifter Muskulatur innervieren (Molliver et al., 2005), und in der glatten Bronchialmuskulatur (eigene unveröffentlichte Ergebnisse) nachgewiesen werden. Der Genort für die humane Untereinheit hASIC3 befindet sich auf Chromosom 7q35. Das Genprodukt ist in seiner Sequenz zu 84% identisch mit dem ASIC3 der Ratte (de Weille et al., 1998).

1.4.1.2 Elektrophysiologische Eigenschaften von ASIC3-Homo- und ASIC3/2b-Heterotetrameren

Tetramere ASICs, die nur aus der Untereinheit 3 bestehen, besitzen eine höhere Permeabilität für Natrium- gegenüber Kaliumionen (Immke et Cleskey, 2001). Diese geringere Durchlässigkeit gegenüber Kaliumionen beruht u.a. auf der intrazellulären prä-transmembranären Domäne 1 (pre-TM1) (Abb. 4), deren Mutation zu einer Permeabilitätsänderung führt (Coscoy et al., 1999).

ASIC3-Homomere öffnen, wenn vier Wasserstoffionen an den Kanal binden, und zeigen bei einem pH-Wert von 6,7 die Hälfte des maximalen Stromflusses, der bei pH 5,0 erreicht wird (Sutherland et al., 2001). Der für ASIC3 typische Ionenfluss kann in zwei Komponenten unterteilt werden, welche beide überwiegend durch Natriumionen getragen werden: Einen schnellen und einen hierauf folgenden, lang anhaltenden Natriumeinwärtsstrom. Letzterer weist eine geringere Amplitude auf (Waldmann et al., 1997). Heteromere ASICs, welche aus den Untereinheiten 2b und 3 bestehen, zeigen im Gegensatz hierzu einen unselektiven, lang anhaltenden Ioneneinwärtsstrom bei erhaltenem schnellen Natriumeinwärtsstrom (Lingueglia et al., 1997). Mit Hilfe der Patch-clamp-Technik und Immunhistochemie konnten de la Rossa et al. an Ratten nachweisen, dass ASIC 2/3-Heterotetramere überwiegend in mittleren und großen DRG-Neuronen (30-60 µm) kolokalisiert sind. Hierbei wurde mit einer immunhistochemischen Doppelmarkierung an DRG-Querschnitten gezeigt, dass ein Großteil aller ASIC3-positiven Neurone auch ASIC2-positiv ist. Um eine mögliche Assoziation der beiden Untereinheiten zu Heterotetrameren in DRG-Neuronen nachzuweisen, wurden einzelne DRG-Neurone isoliert und mit Hilfe der Patch-clamp-Technik untersucht. Durch den Vergleich der hierdurch gewonnenen Stromflusskurven mit bereits bekannten Kurven homo- bzw. heterotetramerer ASICs konnte gezeigt werden, dass ASIC2/3-Heterotetramere nach ASIC1-Homotetrameren die häufigste Kanalanordnung darstellen (de la Rossa et al., 2002).

1.4.1.3 Die Rolle des ASIC3 bei der Nozizeption und Mechanotransduktion

Die Aktivierungsschwelle von ASICs kann durch eine erhöhte Laktat-Konzentration gesenkt werden, da hierdurch Calciumionen chelatisiert werden, welche einen hemmenden Einfluss auf ASICs besitzen (Immke et McClesky, 2001). Calciumionen binden mit hoher Affinität an einen extrazellulären Teil des Kanals und blockieren so die Ionenpore. Diese Bindung kann durch eine Erhöhung der

Wasserstoffionenkonzentration aufgehoben werden (Immke et McCleskey, 2003). Eine Erniedrigung des pH-Wertes von 7.4 auf 7.0 oder sogar 5.4 mit zusätzlicher Erhöhung der Laktat-Konzentration kann bei inflammatorischen Prozessen beobachtet werden (Jacobus et al., 1977). Dieses deutet darauf hin, dass ASICs eine Rolle bei entzündlich bedingten Schmerzen spielen könnten. Ein weiterer Anhaltspunkt hierfür ist die Beobachtung, dass proinflammatorische Mediatoren wie NGF (nerve growth factor), Serotonin, Bradykinin und IL-1 (Interleukin-1) die Bildung von ASIC (v.a. ASIC3) spezifischer mRNA induzieren und somit die ASIC-Expression in Zellkulturen von DRG-Neuronen steigern (Mamet et al., 2002). Hierbei nimmt die Kanaldichte einer einzelnen Zelle zu, wodurch ein gesteigerter Ionenfluss beobachtet wird, der zu einer gesteigerten Erregbarkeit führt. Außerdem kann eine Erhöhung der Anzahl ASIC exprimierender Zellen beobachtet werden (Mamet et al., 2002). Die durch proinflammatorische Mediatoren induzierte Steigerung der ASIC-Expression kann durch nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID) wie Aspirin, Diclofenac und Flurbiprofen gehemmt werden. Ferner inhibieren NSAIDs ASICs auch direkt (Voiley et al., 2001). Neben der Hemmung der Cyclooxygenasen 1 und 2, wodurch die Prostaglandinsynthese herabgesetzt wird (Martinez et al., 2002), könnte dieses ein weiterer Mechanismus sein, der für die Wirkung von NSAIDs verantwortlich ist.

Weitere Arbeiten sprechen den ASICs eine führende Rolle bei der durch Säure bis zu einem pH-Wert von 6 hervorgerufenen Schmerzwahrnehmung beim Menschen zu (Jones et al., 2004; Ugawa et al., 2002). Dieses kann dadurch unterstrichen werden, dass im Tierversuch die Applikation des Diuretikums Amilorid, welches hemmende Eigenschaften gegenüber ASICs besitzt, antinozizeptiv auf durch Säure hervorgerufene Schmerzen wirkt (Ferreira et al., 1999). FMRFamide von *H. aspersa* und FMRFamid ähnliche Neuropeptide, wie die bei Säugetieren vorkommenden Neuropeptide FF (NPFF) und SF (NPSF), sind darüber hinaus in der Lage, die Inaktivierung von ASIC3 bei vorherrschender Azidose zu verlangsamen (Askwith et al., 2000; Deval et al., 2003). Experimentelle Untersuchungen, die einen Anstieg von NPFF-mRNA im Hinterhorn des Rückenmarks unter inflammatorischen Bedingungen belegen (Vilim et al., 1999), deuten auf eine mögliche Beteiligung von Neuropeptiden als endogene Modulatoren von ASICs und damit evtl. auch bei der Schmerzwahrnehmung hin.

Versuche an ASIC3-defizienten Mäusen zeigen jedoch, dass die genauen Funktionen dieser Ionenkanaluntereinheit bei der Nozizeption und anderen

Sinnesmodalitäten wie der Mechanotransduktion noch nicht vollständig aufgedeckt sind. So verhalten sich ASIC3-defiziente Mäuse resistent gegenüber chronischen Muskelschmerzen, die bei Wildtyp-Mäusen durch Säureinjektion in den *M. gastrocnemius* induziert werden können (Price et al., 2001; Sluka et al., 2003). Ebenfalls konnte elektrophysiologisch gezeigt werden, dass die nozizeptive Antwort bzgl. kutaner Noxen wie Säure und Hitze bei ASIC3-Defizienz abgeschwächt ist. Diese Beobachtung resultiert jedoch nicht in einer Verhaltensänderung zwischen ASIC3-defizienten und -nicht-defizienten Mäusen (Price et al. 2001). Chen et al. konnten sogar zeigen, dass ASIC3-defiziente Mäuse empfindlicher auf nozizeptive Stimuli hoher Intensität reagieren. Hierbei ist es egal, welche Schmerzqualität diese Reize besitzen (Chen et al., 2002).

Betrachtet man die Arbeiten, die sich mit der Rolle von ASIC3 als mechanotransduktivem Ionenkanal beschäftigen, stellt man fest, dass auch auf diesem Gebiet verschiedene Arbeitsgruppen zu zunächst widersprüchlich erscheinenden Ergebnissen kommen. Durch die Herstellung eines Haut-Nerven-Präparates konnten Price et al. an ASIC3-defizienten Mäusen für verschiedene Nervenfasertypen unterschiedliche Sensitivitätsänderungen bzgl. mechanischer Reize beschreiben. So zeigen große, myelinisierte, schnell adaptierende A β -Fasern eine fast zweifache Sensitivitätszunahme bei ASIC3-defizienten Mäusen, wohingegen die Sensitivität von schwach myelinisierten A δ -Mechanonozizeptoren abnimmt (Price et al., 2001). Drew et al. untersuchten Perikarya unterschiedlicher Größe von Neuronen aus Zellkulturen auf ihre Antwort bzgl. mechanischer Reize: Hierbei zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen Zellen aus ASIC3-defizienten und -nicht-defizienten Tieren (Drew et al., 2004).

Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten von ASIC3 bzgl. mechanischer und nozizeptiver Reizen könnte in der Interaktion mit anderen Proteinen liegen. So könnte Stomatin, ein integrales Membranprotein, ASIC3 dadurch, dass es diesen mit zytoplasmatischen Elementen verbindet, zum Mechanotransduktor machen und in seiner nozizeptiven Funktion, insbesondere bzgl. pH-Wert-Änderungen, einschränken. Einen Hinweis hierauf liefern Untersuchungen, die zeigen, dass der ASIC3-typische, durch Wasserstoffionen induzierte Stromfluss durch eine Assoziation von ASIC3 mit Stomatin abgeschwächt wird (Price et al., 2004).

Abschließend können die exakten Funktionen von ASIC3 noch nicht genau definiert werden. Vieles spricht aber dafür, dass ASIC3 Funktionen in der Nozizeption und Mechanotransduktion übernimmt. Evtl. ist ASIC3 an der Transduktion verschiedener Sinnesmodalitäten beteiligt, indem er zum einen mit verschiedenen ASIC-Untereinheiten zu Tetrameren assoziiert, zum anderen in Interaktion mit anderen Proteinen tritt.

1.4.2 Der Vanilloid Rezeptor 1 (TRPV1)

Ionenkanäle, die zur *transient receptor potential-* (TRP) Familie zählen, wurden zuerst in Photorezeptoren der Taufliege *Drosophila* nachgewiesen (Minke, 1977; Minke, 1982). Die Zugehörigkeit zu dieser Ionenkanalfamilie definiert sich durch Sequenzhomologie. Alle TRP-Kanäle bestehen vermutlich aus sechs transmembranären Untereinheiten, welche zu einem Tetramer assoziieren (Clapham, 2003). Bisher konnte nachgewiesen werden, dass TRP-Kanäle als Sensoren von mechanischen Reizen (Sidi et al., 2003), Osmolarität (Kondoh et al., 2003), Pheromonen (Liman et al., 1999), Geschmacksqualitäten (Perez et al., 2002; Perez et al., 2003), pH-Wert und Temperatur (Caterina et al., 1997) dienen.

Ein Mitglied der TRP-Familie ist der Vanilloid Rezeptor 1 (TRPV1 oder VR1), der durch Capsaicin (Abb. 5), dem scharfen Inhaltsstoff mehrerer Paprikaarten (*Capsicum sp.*), aktiviert werden kann (Gavva et al., 2004). Dieser Capsaicin-sensitive Phänotyp ermöglichte es Caterina et al., den TRPV1 der Ratte zu klonieren (Caterina et al., 1997). Mittlerweile konnte auch das humane Homologon des Vanilloid Rezeptors 1 (hTRPV1 oder hVR1) kloniert und auf Chromosom 17q13 lokalisiert werden (Hayes et al., 2000).

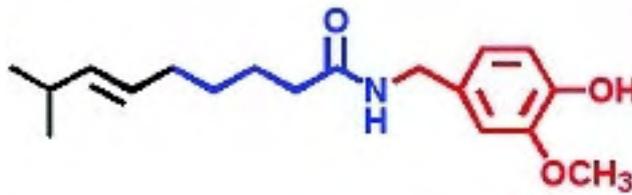


Abb. 5: Strukturformel von Capsaicin. Die 3-Methoxy-4-Hydroxy-Benzylamin-Gruppe, welche auch Vanillamin-Gruppe genannt wird (rot), ist das Charakteristikum der Vanilloide. Eine B- oder Linker-Region (blau) verbindet die Vanillamin-Gruppe mit einer aliphatischen C-Region (schwarz). (aus Di Marzo, 2004)

1.4.2.1 Lokalisation des TRPV1

DRGs weisen im Vergleich zu anderen Organen eine relativ hohe Expression von TRPV1-mRNA auf. Als klassischer Marker nozizeptiver Neurone ist der TRPV1 vornehmlich in kleinen DRG-Neuronen lokalisiert, welche hauptsächlich unmyelinisierte C-Fasern entsenden (Tominaga et Julius, 2000). Ferner kann der TRPV1 aber auch in DRG-Neuronen nachgewiesen werden, welche gleichzeitig Immunreaktivität für ein NF zeigen, einem Marker myelinisierter Neurone mit A-Faser-Qualität (Ma, 2002).

Außerdem konnte TRPV1-mRNA auch in ZNS-Strukturen wie der Großhirnrinde, dem Hippocampus und dem Kleinhirn detektiert werden (Sanchez et al., 2001). Zu den peripheren Geweben, die durch TRPV1-immunreaktive Nervenfasern innerviert werden, gehören u.a. die Blase (Yiangou et al., 2001), der Gastrointestinaltrakt (Chan et al., 2003; Ward et al., 2003), die Zahnpulpa (Renton et al., 2003) und der gesamte Respirationstrakt inkl. Trachea, Bronchien, Bronchioli und Alveolen (Watanabe et al., 2005). Zusätzlich kann eine TRPV1-Expression in nicht-neuronalen Strukturen wie fetalen Kardiomyozyten (Dvorakova et Kummer, 2001), den Keratinozyten der Epidermis (Southall et al., 2003), dem Urothel (Birder et al., 2001), Bronchialepithelzellen, Hepatomazellen (Reilly et al., 2003) und neutrophilen Granulozyten (Heiner et al., 2003) nachgewiesen werden.

1.4.2.2 TRPV1-Homotetramere

TRPV1-Untereinheiten assoziieren zu Homotetrameren, die einen Ionenkanal bilden (Kedei et al., 2001; Premkumar et al. 2002). Eine Untereinheit setzt sich aus sechs transmembranären Segmenten (TM1-TM6) zusammen, die durch intra- und

extrazelluläre Schleifen verbunden sind (Abb. 6). TM5 und TM6 werden durch eine besonders lange Schleife verbunden, welche P-Schleife (P-Loop) genannt wird (Ferrer-Montiel et al., 2004). Bisher wurden verschiedene Funktionen für die transmembranären Segmente, intra- und extrazellulären Schleifen und die zytoplasmatischen C- und N-terminalen Regionen diskutiert.

Das Capsaicin, ein Vanilloid und TRPV1-Agonist, besitzt beispielsweise eine intrazelluläre Bindungsstelle zwischen TM2 und TM4 (Jung et al., 1999; Gavva et al., 2004). Vanilloide bestehen aus drei funktionellen Regionen (Abb. 5): Einer aromatischen A-Region, welche eine Vanillamin- (3-Methoxy-4-Hydroxy-Benzylamin-) Gruppe besitzt, einer B- oder Linker-Region, welche eine Ester- oder Amid-Gruppe aufweist und einer aliphatischen C-Region. Die aliphatische C-Region könnte hydrophobisch mit einer „Rezeptormulde“ in Interaktion treten (Ferrer-Montiel et al., 2004). Da die zytoplasmatische Region des TRPV1 zwischen TM2 und TM4 eine hydrophobe „Mulde“ aufweist und die transmembranären Segmente TM2 und TM3 die Sensitivität gegenüber Vanilloiden bestimmen (Gavva et al., 2004), könnte hier eine intrazelluläre Bindungsstelle für Vanilloide vorliegen (Ferrer-Montiel et al., 2004). Die Region zwischen TM5 und TM6 ist mit ihrer P-Schleife an der Bildung einer Ionenpore beteiligt (Ferrer-Montiel et al., 2004). Die extrazellulären Verbindungsregionen, die TM5 und TM6 mit der P-Schleife verbinden, könnten als Filter für divalente Kationen fungieren. So konnten García-Martínez et al. eine Herabsetzung der Permeabilität für divalente Kationen nachweisen, wenn die saure Aminosäure (AS) Aspartat in Position 646 der TM6-nahen Verbindungsregion durch die neutrale AS Asparagin ersetzt wird (García-Martínez et al., 2000).

Die N-terminale, zytoplasmatisch gelegene Region des TRPV1 enthält eine Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase A (PKA) (Ferrer-Montiel et al., 2004) und drei Ankyrin-Regionen (Clapham, 2003). Die PKA ist ein Enzym, welches durch intrazelluläre Botenstoffe aktiviert werden kann und die Aktivität von Zielproteinen durch spezifische Phosphorylierung von Serin- oder Threoninresten beeinflusst (Stryer, 1995). Ankyrin ist ein Protein, welches Ionenkanäle mit dem Zytoskelett verbindet und so vermutlich zu dessen Stabilisierung beiträgt (Stevens et Lowe, 1997).

Die C-terminale Region des TRPV1, welche ebenfalls intrazellulär liegt, beinhaltet eine TRP-ähnliche Dömane (*TRP-like domain*), die bei den verschiedenen Mitgliedern der TRP-Ionenkanalfamilie mehr oder weniger konserviert vorkommt

(Clapham, 2003). Diese TRP-ähnliche Domäne soll als Assoziationsdomäne fungieren, welche für Bildung von TRPV1-Homotetrameren notwendig ist. Des Weiteren könnte diese Domäne eine evolutionär konservierte Region der TRP-Ionenkanalfamilie sein, die an der Ausbildung von Multimeren aus Kanaluntereinheiten involviert ist (Garcia-Sanz et al., 2004). Außerdem enthält die C-terminale Region zwei Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (PKC) (Bhave et al., 2003), wobei eine dieser Phosphorylierungsstellen ebenfalls von der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII) phosphoryliert werden kann (Jung et al., 2004). Eine PKC-abhängige Phosphorylierung potenziert die Antwort des TRPV1 auf Temperaturreize und Capsaicin (Premkumar et Ahern, 2000; Ahern et Premkumar, 2002). Darüber hinaus scheint die PKC einer Tachyphylaxie, welche nach wiederholter Capsaicinapplikation auftritt, entgegenzuwirken (Mandadi et al., 2004). Die CaMKII wird durch Bindung von Ca^{2+} -Calmodulin aktiviert und ist hieraufhin in der Lage, Zielproteine zu phosphorylieren (Stryer, 1995). Die Phosphorylierung des TRPV1 an der CaMKII-Phosphorylierungsstelle ist für eine Aktivierung durch Capsaicin notwendig. Umgekehrt führt eine Dephosphorylierung durch Calcineurin zu einer Inaktivierung des TRPV1 (Jung et al., 2004). Ferner besitzt die C-terminale Region jeweils eine Bindungsstelle für Calmodulin (CaM) und Phosphatidyl-4,5-bisphosphat (PIP_2) (Prescott et Julius, 2003). Numazaki et al. stellten die Hypothese auf, dass eine Calcium-abhängige Bindung von Calmodulin zu einer Desensibilisierung des TRPV1 führe. Ihre Untersuchungen konnten jedoch lediglich beweisen, dass TRPV1-Kanäle mit fehlender Calmodulin-Bindungsstelle eine stark herabgesetzte Desensibilisierung gegenüber kurzfristiger Capsaicinapplikation zeigen (Numazaki et al., 2003). Mutationen, die die PIP_2 -Bindungsstelle betreffen und die PIP_2 -TRPV1-Interaktion abschwächen, setzen die Schwelle für chemische und thermische Reize herab (Prescott et Julius, 2003).

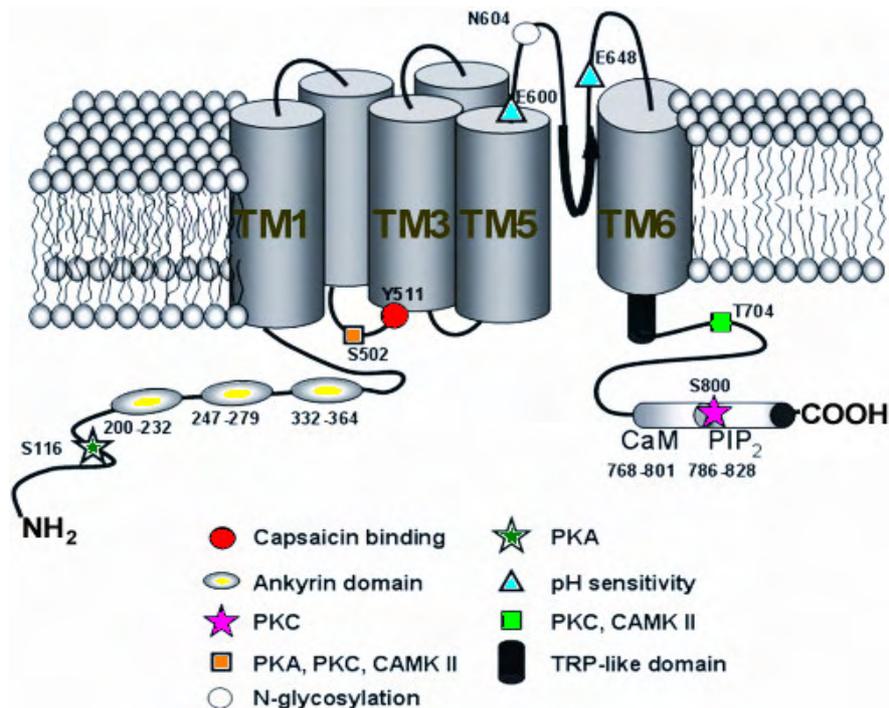


Abb. 6: TRPV1-Untereinheit. Die Nummern geben die Aminosäurenummer der Rattensequenz an. Einzelheiten s. Text. (modifiziert nach Ferrer-Montiel et al., 2004)

1.4.2.3 Elektrophysiologische Eigenschaften des TRPV1

Mit Hilfe der Patch-clamp-Technik konnten einige Eigenschaften von TRPV1-Homotetrameren aufgedeckt werden. So konnten Caterina et al. an Zellkulturneuronen, welche den TRPV1 exprimierten, zeigen, dass der durch Capsaicin hervorgerufene Ionenfluss zu einem großen Teil durch divalente Kationen getragen wird. Die Permeabilität für Kationen nimmt in folgender Reihenfolge ab: $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ \approx \text{K}^+ \approx \text{Cs}^+$. Darüber hinaus konnte diese Arbeitsgruppe nachweisen, dass der TRPV1 eine Calcium-abhängige Desensibilisierung besitzt, welche in einem Calcium-freien Medium nicht beobachtet werden konnte (Caterina et al., 1997).

Neben den ASICs (s. 1.4.1) gehört auch der TRPV1 zu den pH-sensitiven Ionenkanälen (Caterina et al., 1997). TRPV1-Homotetramere zeigen jedoch eher einen lang anhaltenden Stromfluss, wohingegen ASICs eher einen schnell ansteigenden Stromfluss mit einer darauf folgenden, lang anhaltenden Komponente aufweisen (Caterina et al., 1997; Waldmann et Lazdunski, 1998; Liu et al., 2004).

Ein weiterer Unterschied zwischen diesen pH-sensitiven Ionenkanälen besteht darin, dass ASICs (insbesondere ASIC3-Homo- und Heterotetramere) direkt durch Wasserstoffionen aktivierbar sind (Lingueglia et al., 1997; Sutherland et al., 2001).

An TRPV1-exprimierenden Oozyten des Frosches *Xenopus* konnte elektrophysiologisch hingegen gezeigt werden, dass Wasserstoffionen allein nicht in der Lage sind, den TRPV1 zu aktivieren. Jedoch wird ein durch Capsaicin hervorgerufener Stromfluss durch pH-Wert-Senkung potenziert (Caterina et al., 1997).

Ahern et Premkumar gelang es an *Xenopus*-Oozyten zu zeigen, dass der TRPV1 neben einer pH- auch eine Spannungsabhängigkeit besitzt. So bewirkt eine Membrandepolarisierung im Synergismus mit TRPV1-Agonisten eine Verstärkung des Stromflusses durch den Ionenkanal (Ahern et Premkumar, 2002).

Des Weiteren konnte auch eine Temperaturabhängigkeit des TRPV1 nachgewiesen werden. An HEK- (human embryonic kidney-derived) Zellen und Oozyten konnte gezeigt werden, dass eine Temperatur $>43^{\circ}\text{C}$ einen TRPV1-bedingten Stromfluss hervorrufen kann (Caterina et al., 1997; Tominaga et Julius, 2000).

1.4.2.4 Agonisten, Antagonisten und Modulatoren des TRPV1

Das Vanilloid Capsaicin wurde bereits als klassischer TRPV1-Agonist erwähnt. Mit Resiniferatoxin, einem Inhaltsstoff der Wolfsmilch (*Euphorbia* sp.), konnte ein noch potenterer Agonist gefunden werden. Wie das Capsaicin besitzt auch Resiniferatoxin eine Vanillamin-Gruppe (Szallasi et Blumberg, 1990; Di Marzo, 2004).

Das Capsazepin, ein synthetisches Analogon des Capsaicins, gilt als klassischer kompetitiver Antagonist (Bevan et al., 1992; Tominaga et Julius, 2000) und der Farbstoff Rutheniumrot als nicht-kompetitiver TRPV1-Antagonist (Dray et al., 1990; Amann et Maggi, 1991). Beide Antagonisten inhibieren eine TRPV1-Aktivierung durch Capsaicin deutlich stärker als eine Aktivierung durch Temperatur (Nagy et Rang, 1999).

Wie schon in 1.4.2.3 dargestellt, kann der TRPV1 neben einer Aktivierung durch Temperatur $>43^{\circ}\text{C}$ auch durch Wasserstoffionen und Depolarisation exzitationssteigernd moduliert werden.

Die Effekte einer Phosphorylierung an bestimmten Phosphorylierungsstellen sowie die Bindung von CaM oder PIP_2 an den TRPV1 wurden ausführlich in 1.4.2.2 beschrieben.

Neben exogenen Liganden des TRPV1 wie Capsaicin oder Resiniferatoxin gibt es auch eine Reihe endogener Liganden. Von der Selt und Di Marzo stellten folgende Kriterien auf, die einen endogenen Liganden zu einem Endovanilloid machen: Ein

Endovanilloid sollte von Zellen synthetisiert werden und in einer aktivitätsabhängigen Art freigesetzt werden. Die freigesetzte Konzentration sollte gleichzeitig hoch genug sein, um direkt an den TRPV1 zu binden und ihn zu aktivieren. Substanzen wie N-Arachidonoyldopamin, Lipoxygenaseprodukte der Arachnoidensäure und Anandamid erfüllen diese Eigenschaften (van der Stelt et Di Marzo, 2004).

N-Arachidonoyldopamin ist in der Lage, in HEK-Zellen und isolierten DRG-Neuronen, welche den TRPV1 exprimieren, diesen Ionenkanal mit ähnlicher Effizienz wie Capsaicin zu aktivieren. Außerdem konnte N-Arachidonoyldopamin in Hirnstrukturen wie dem Striatum, dem Hippocampus, dem Kleinhirn, dem Thalamus und in geringerer Konzentration auch in DRGs nachgewiesen werden (Huang et al., 2002). Das 12-Lipoxygenase-Produkt 12-Hydroperoxyeicosatetraensäure (12-HPETE) ist ein potenter TRPV1-Agonist (Hwang et al., 2000). An isolierten DRG-Neuronen von embryonalen Ratten konnte gezeigt werden, dass Bradykinin über den Bradykininrezeptor B2 in der Lage ist, den TRPV1 durch eine Induktion der Produktion von 12-Lipoxygenase-Metaboliten zu aktivieren (Shin et al., 2002). Ferreira et al. konnten dieses bestätigen, indem sie an Mäusen in vivo nachweisen konnten, dass der TRPV1 für durch Bradykinin ausgelöste Schmerzen notwendig ist (Ferreira et al., 2004). Untersuchungen von Kollarik et Udem an isolierten und perfundierten Nerv-Lungen-Präparationen TRPV1-defizienter Mäuse zeigten zudem, dass durch Bradykinin hervorgerufene Nervenentladungen bei einer TRPV1-Defizienz weniger persistierend sind (Kollarik et Udem, 2003).

Das Cannabinoid Anandamid war der erste entdeckte endogene Ligand, der den humanen TRPV1 aktivieren kann (Smart et al., 2000). Bronchopulmonale vagale C-Faser-Afferenzen in Mäusen lassen sich ebenfalls durch Anandamid aktivieren. Dieses ist in TRPV1-defizienten Mäusen jedoch nicht der Fall (Kollarik et Udem, 2003).

1.4.2.5 TRPV1 als Marker polymodaler Nozizeptoren

Durch eine intradermale Injektion des Seetangextraktes Carrageenan wird eine Entzündungsreaktion in Rattenpfoten induziert. Kwak et al. zeigten an Ratten, welche mit diesem Prozedere behandelt wurden, eine verkürzte Latenzzeit bzgl. des reflektorischen Wegziehens der entzündeten Pfote auf mechanische Reizung. Eine intradermale Injektion von Capsazepin in diese Pfote verlängerte diese Latenzzeit bei

weiterbestehender Inflammation. Hieraus schloss diese Arbeitsgruppe, dass eine endogene Capsaicin-ähnliche Substanz, welche durch Capsazepin antagonisiert werden kann, für die Hyperalgesie in entzündetem Gewebe verantwortlich sein könnte, indem sie nozizeptive Impulse via TRPV1 generiert (Kwak et al., 1998). Die in 1.4.2.5 erwähnten Endovanilloide könnten als solche Capsaicin-ähnliche Substanzen fungieren.

Davis et al. konnten die von Kwak et al. beobachteten Ergebnisse durch Untersuchungen an TRPV1-defizienten Mäusen unterstreichen: Eine Carrageenan-induzierte Pfotenentzündung führte bei diesen Mäusen nicht zu thermischer Hyperalgesie. Paradoxerweise reagierten TRPV1-defiziente Mäuse jedoch normal auf durch Hitze hervorgerufene Schmerzreize, wohingegen isolierte DRG-Neurone mit Perikaryagrößen $<22 \mu\text{m}$ von TRPV1-defizienten Mäusen elektrophysiologisch keine spezifische Antwort auf hohe Temperaturen zeigten (Davis et al., 2000). Caterina et al. wiederum beobachteten eine herabgesetzte Antwort auf schmerzauslösende Temperaturreize bei TRPV1-defizienten Mäusen (Caterina et al., 2000). Weitere Untersuchungen an DRG-Neuronen aus TRPV1-defizienten Mäusen konnten außerdem eine Abschwächung der Antwort auf Noxen wie Capsaicin und Protonen darlegen (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000), was ebenfalls auf eine Funktion des TRPV1 als Marker nozizeptiver Neurone hinweist.

Unterstrichen wird dieses durch Beobachtungen an Ratten, die belegen, dass DRGs, welche den Gastrointestinaltrakt versorgen, nach oraler Applikation von 0,5 M HCl (einer etablierten Methode zur Generierung einer Hyperalgesie) einen erhöhten TRPV1-Protein-Gehalt aufweisen (Schicho et al., 2004).

Durch die zahlreichen hier dargestellten Funktionen des TRPV1 kann dieser Ionenkanal als Marker für polymodale Nozizeptoren betrachtet werden, der durch Noxen wie Temperatur, Protonen und Vanilloide, aber auch inflammatorische Mediatoren und bisher evtl. unbekannte Substanzen moduliert oder aktiviert werden kann. Klinisch könnte dem TRPV1 somit eine entscheidende Rolle bei der Therapie von inflammatorischer Hyperalgesie oder Tumorschmerzen zukommen, wie erste tierexperimentelle Ansätze bereits zeigen konnten. So konnte an Ratten gezeigt werden, dass der potente TRPV1-Agonist Resiniferatoxin selektiv nozizeptive Nervenfasern bei peripherer Applikation und DRG-Neurone bei intraganglionärer Applikation zerstören kann. Die periphere Applikation führt zu einer reversiblen, die intraganglionäre Applikation zu einer irreversiblen durch Zytotoxizität verursachten

Analgesie (Karai et al., 2004). Der Mechanismus, der zu dieser selektiven Neuronenzytotoxizität führt, kann durch eine TRPV1-vermittelte Calciumüberladung des Neurons mit anschließendem Zelltod erklärt werden (Olah et al., 2001). Darüber hinaus findet topisch applizierte Capsaicin-Creme bereits klinische Anwendung bei der Therapie der diabetischen Neuropathie (Hauner et Scherbaum, 1999; Mendell et Sahenk, 2003).

Es ist davon auszugehen, dass sich in Zukunft noch weitere Therapiekonzepte in der Schmerztherapie etablieren werden, deren molekularer Mechanismus durch eine Interaktion mit dem TRPV1 erklärt werden kann.

1.5 Neurofilament 68 kD (NF68)

1.5.1 Neurofilamente sind Intermediärfilamente

Neurofilamente sind in Neuronen vorkommende Biopolymere, die der Gruppe der Intermediärfilamente (IM) zugeordnet werden können. Zusammen mit Mikrofilamenten und Mikrotubuli bilden IM das Zytoskelett eukaryontischer Zellen. Der Name *Intermediärfilament* leitet sich von dem Durchmesser dieses Filamentsystems ab: Mit 8 – 10 nm liegt er genau *zwischen* dem der Mikrofilamente (7 nm) und dem der Mikrotubuli (25 nm) (Drenckhahn, 1994). Auf Grund von Sequenzhomologien in ihren Zentraldomänen (s.u.) lassen sich IM in verschiedene Klassen unterteilen (Sequenzhomologieklassen (SHK)) (Tab. 2).

SHK	Proteinbezeichnung	Typisches Vorkommen
I	Saure Keratine	In allen Epithelien
II	Basische Keratine	In allen Epithelien
III	Vimentin	Zellen mesenchymaler Herkunft
III	Desmin	Muskelzellen
III	Saures Gliafilamentprotein (GFAP)	Gliazellen, Astrozyten, Sternzellen der Leber
III	Peripherin	Periphere Neurone und deren Fortsätze
III / IV	Nestin	Neuroepitheliale Stammzellen
IV	α -Internexin	Zentrale Nervenzellen und deren Axone
IV	Neurofilamentprotein (NF-L, NF-M, NF-H)	Zentrale und periphere Nervenzellen und deren Fortsätze
V	Lamine	Zellkern aller Zellen

Tab. 2: Auswahl von Intermediärfilamenten und deren Unterteilung in SHK. In Anlehnung an Drenckhahn, 1994; Coulombe et al., 2001 und Herrmann, 2002.

1.5.2 Aufbau und Struktur der Intermediärfilamente

Der Grundbaustein der IM ist ein Protein, das aus einer etwa 310 (SHK I – IV) bzw. 352 (SHK V) Aminosäuren (AS) langen Zentraldomäne und den N- und C-terminalen Enddomänen besteht, welche in ihrer Länge stark variieren können (Abb. 7a). Die Zentraldomäne kann in die Subdomänen 1A, 1B, 2A und 2B unterteilt werden, die durch die drei *linker*-Regionen L1, L12 und L2 verbunden werden (Steinert et Roop, 1988). Die vier Subdomänen weisen die bereits 1951 von Pauling und Corey postulierte Proteinstruktur einer α -Helix auf. Unter der α -Helix wird eine stabförmige Struktur verstanden, die dadurch gekennzeichnet ist, dass die CO-Gruppe jeder AS eine Wasserstoffbrücke zur NH-Gruppe der AS, die in ihrer linearen Sequenz vier

Reste von ihr entfernt liegt, bildet. Hierdurch entsteht alle 3,6 AS eine volle Drehung (Pauling et al., 1951; Stryer, 1995). Die α -helikalen Abschnitte zweier Zentraldomänen winden sich zu einer Superhelix, auch *coiled-coil* genannt, parallel umeinander (Abb. 7b). Diese Anordnung wird durch ein heptagoides Repetitionsmuster in den α -helikalen Domänen begünstigt: Dabei ist von jeweils sieben aufeinanderfolgenden AS jede erste und vierte hydrophob. Die hydrophoben AS der Zentraldomänen zweier Intermediärfilamentproteine lagern sich einander an und bilden somit den Kern der Superhelix (Steinert et Roop, 1988). Zwei solcher polaren Dimeren assoziieren antiparallel zueinander zu einem apolaren Tetramer (Abb. 7c). Diese Tetramere bilden durch Assoziation sog. Protofilamente mit einem Durchmesser von 2-3 nm (Abb. 7d). Acht Protofilamente lagern sich schließlich zu einem 8-10 nm dicken Intermediärfilament zusammen (Abb. 7e) (Fuchs et Cleveland, 1998; Al-Chalabi et Miller, 2003).

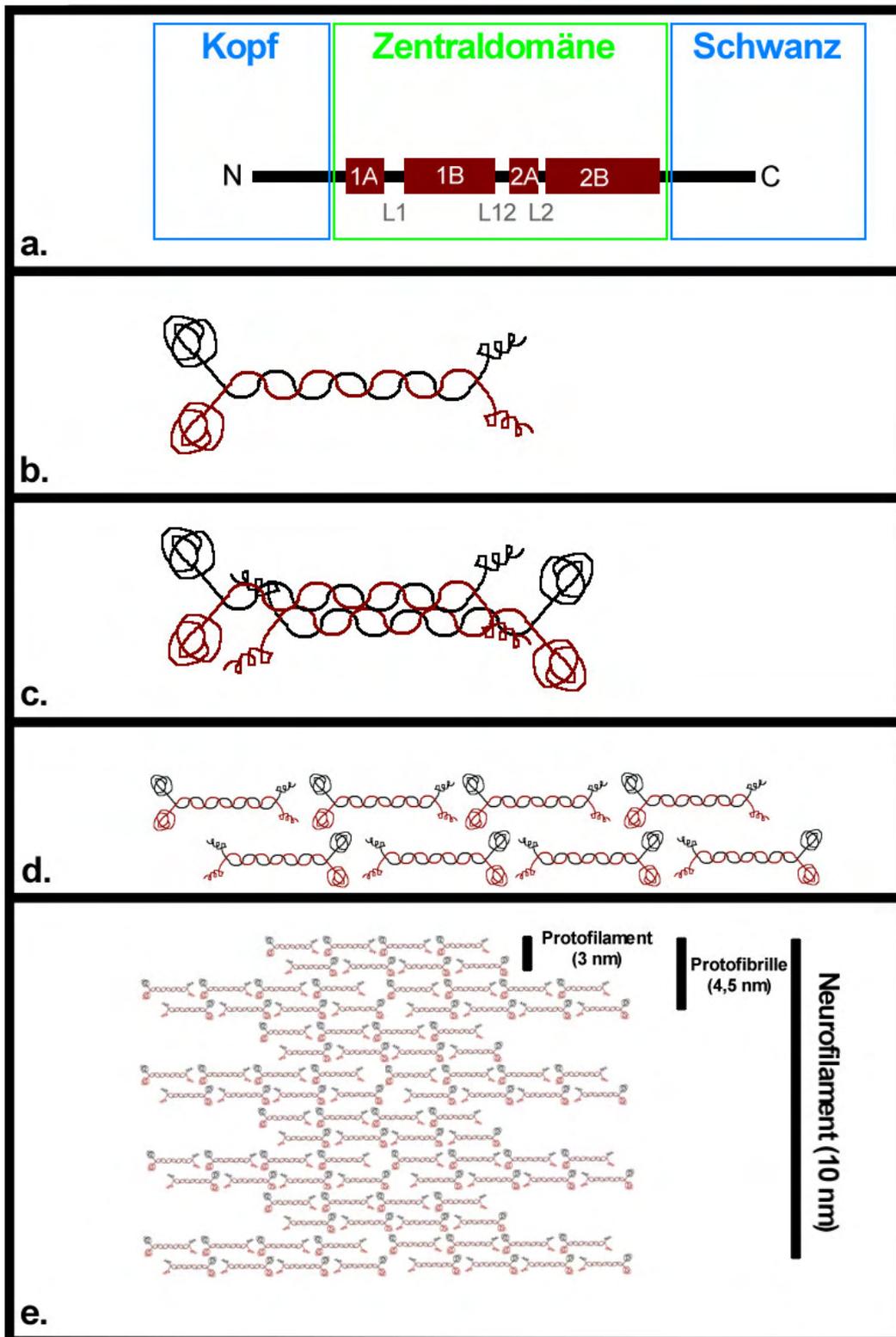


Abb. 7: Ein Neurofilamentprotein besteht aus der Zentralkomäne, der N-terminalen (Kopf) und C-terminalen (Schwanz) Endomäne **(a)**. Ein Dimer besteht aus zwei Proteinen, die zu einer Superhelix assoziieren **(b)**. Zwei Dimere lagern sich antiparallel zueinander zu einem Tetramer zusammen **(c)**. Durch gestaffelte Anordnung bilden sich hieraus Protofilamente **(d)**. Zwei Protofilamente bilden eine Protofibrille und vier Protofibrillen ein Neurofilament **(e)**. (In Anlehnung an Steinert et Roop, 1988; Fuchs et Cleveland, 1998; Koolman et Röhme, 1998; Coulombe et al., 2001)

1.5.3 Neurofilamentproteine assoziieren zu Polymeren

In Neuronen von Säugetieren können drei Neurofilamentproteine auf Grund ihres Molekulargewichtes unterschieden werden. Bei der Ratte sind dies 68 kD (NF-Low), 160 kD (NF-Medium) und 200 kD (NF-Haevy) (Hoffman et Lasek, 1975; Schlaepfer et Freeman, 1978). Das humane Homologon des NF-L aus der Ratte konnte auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 lokalisiert werden (Hurst et al., 1987). In der Art und Weise, wie diese drei Neurofilamentproteine miteinander zu Filamenten assoziieren, konnten Carter et al. Unterschiede zwischen Menschen und Nagetieren aufdecken. So kann beim Menschen sowohl die Möglichkeit der Ausbildung von NF-L-Homopolymeren als auch NF-L- und NF-M- bzw. NF-H-Heteropolymeren nachgewiesen werden. Hingegen ist bei Nagetieren die Assoziation zu NF-L-Homopolymeren nicht möglich (Carter et al., 1998). Im Gegensatz zum NF-L besitzen NF-M und NF-H eine sehr lange C-terminale Enddomäne mit 439 AS-Resten bei NF-M und 660 AS-Resten bei NF-H (Hirokawa et Takeda, 1998). Ein Heteropolymer der drei Untereinheiten besteht aus einem Rückgrat („backbone“), welches aus den Zentraldomänen und den NH-terminalen Enddomänen hervorgeht. Die C-terminalen Enddomänen von NF-M und NF-H bilden um dieses Rückgrat radiär verlaufende Seitenarme (Hisanaga et Hirokawa, 1988).

1.5.4 Neurofilamente sind eine Determinante des axonalen Durchmessers

Die von den C-terminalen Enddomänen gebildeten Seitenarme weisen zahlreiche Phosphorylierungsstellen auf (Betts et al., 1997; Jaffe et al., 1998), die u.a. eine Determinante des axonalen Durchmessers darstellen könnten. Es wird diskutiert, dass diese Enddomänen einen bestimmten Abstand zwischen den einzelnen Filamenten aufrecht erhalten (Geisler et al., 1983). Dieses könnte 1. durch Quervernetzungen (Leterrier et al., 1996), 2. durch Phosphorylierung und daraus resultierender negativer elektrostatischer Abstoßung (Kumar et al., 2002a, b) oder 3. durch thermisch-bedingte Bewegung zwischen den Seitenarmen erklärt werden (Brown et Hoh, 1997).

Darüber hinaus kann ein Zusammenhang zwischen der Expression von Neurofilamentgenen und dem axonalen Kaliber großer myelinisierter Nervenfasern nachgewiesen werden (Hoffman et al., 1987). So führt eine vermehrte Expression aller drei Neurofilamentsubtypen in transgenen Mäusen zu einem Anstieg des axonalen Kalibers. Eine alleinige Expressionsteigerung von NF-L hingegen resultiert

in einem geringeren Abstand zwischen den NF und damit einer erhöhten Neurofilamentdichte bei gleichzeitiger axonaler Kaliberreduktion (Xu et al., 1996). Dieses steht im Einklang mit der Hypothese, dass die Aufgabe von NF-M und NF-H mit ihren langen C-terminalen Seitenarmen in der Aufrechterhaltung des Interfilamentabstandes besteht (s.o.).

Eine weitere Determinante des Interfilamentabstandes konnte von Kumar et al. aufgedeckt werden: Mäuse mit einer Defizienz des Myelin-assoziierten Glykoproteins (MAG) - ein in den internodalen Abschnitten myelinisierter Axone vorkommendes Membranprotein - weisen eine höhere Filamentdichte bei herabgesetzter Phosphorylierung von NF-M und NF-H und gleichzeitig einen geringeren axonalen Durchmesser auf (Yin et al., 1998; Kumar et al., 2002b).

Ein anderer Aspekt, der ebenfalls Einfluss auf die Nervenfaserdicke haben könnte, ist der axonale Transport von NF, welche nur im Perikaryon synthetisiert werden können. So stellt der axonale Transport die Quelle für die periphere Verteilung von NF dar und somit auch eine Determinante des axonalen Durchmessers (Hoffman et al., 1984). Wang et al. konnten zeigen, dass der zunächst postulierte langsame axonale Transport von NF (Hoffman et al., 1975) vermutlich aus zwei Komponenten besteht: Einer Phase des schnellen Transportes, die von prolongierten Pausen unterbrochen wird (Wang et al., 2000).

1.5.5 Neurofilamente dienen der axonalen Stabilisierung

Die Aufgabe von NF scheint neben der Determination des axonalen Durchmessers in der axoplasmatischen Stabilisierung von Neuronen zu liegen (Morris et Lasek, 1982). So sind NF vermutlich dafür verantwortlich, dass Nervenzellfortsätze, wenn durch Biegung seitliche Zugkräfte auftreten, ihre zylindrische Form aufrechterhalten. Außerdem dienen sie auch der Verankerung von Ionenkanalproteinen wie dem TRPV1 (s.o.) mit dem Zytoskelett (Stevens et Lowe, 1997).

1.5.6 Defekte in Neurofilamentgenen können zu Erkrankungen führen

Abschließend können NF als strukturelle Komponenten des Neurons mit der Aufgabe der Stabilisierung und Determination des axonalen Kalibers betrachtet werden. Dieses hat auch pathologische Konsequenzen: So können verschiedene Typen der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit auf Gendefekte des NF-L-Gens zurückgeführt werden. Klinisch äußert sich dieses in einer motorischen und sensorischen

Neuropathie, welche durch demyelinisierende Prozesse verursacht wird. Des Weiteren konnte ein Gendefekt des NF-H-Gens als Riskofaktor für die amyotrophe Lateralsklerose, bei der es zum Verlust von myelinisierten Motorneuronen kommt, identifiziert werden (Omary et al., 2004).

1.6 Ziele und Fragestellungen

Die Innervation der Pleura ist ein bisher in der Literatur wenig beleuchtetes Thema. Da aber insbesondere die parietale Pleura mit ihren sensiblen Afferenzen für die Generation von Pleuraschmerzen bei den verschiedensten, die Pleura betreffenden Erkrankungen von Bedeutung sein soll, scheint eine genaue Charakterisierung dieser Afferenzen längst überfällig. Diese Arbeit soll hierzu einen Beitrag leisten.

Das retrograd-neuronale Tracing ist eine etablierte Methode, mit welcher die Perikarya der Afferenzen verschiedenster Organe identifiziert werden können. Zu den zahlreichen Organen, die bisher durch retrograd-neuronale Markierung untersucht wurden, gehören u.a. die Lunge (Springall et al., 1987; Kummer et al., 1992; Helbig et al., 2005; Groth et al. 2006), die Niere (Zheng et Lawson, 1994) oder der Gastrointestinaltrakt (Patterson et al., 2003). In dieser Arbeit sollen erstmals durch Applikation eines lipophilen Tracers die Perikarya pleuraler Afferenzen der Ratte identifiziert werden. Darüber hinaus soll ein Augenmerk auf Mechanismen der Clearance des Tracers aus dem Pleuraspalt geworfen werden.

Die als pleurale Afferenzen identifizierten Neurone sollen in einem zweiten Schritt in Populationen und Subpopulationen unterteilt werden. Die Unterteilung in verschiedene Populationen soll auf Grund des Perikaryondurchmessers und der Immunreaktivität bzgl. NF68 vorgenommen werden. Mit Hilfe dieser beiden Parameter ist es möglich, Neurone in $A\alpha/\beta > A\delta$ -, $A\delta > A\alpha/\beta$ - und C-Faserpopulationen einzuteilen (Lawson et Waddell, 1991).

Diese Populationen sollen in einem weiteren Schritt auf ihre Immunreaktivität bzgl. ASIC3 und TRPV1 untersucht und so in Subpopulationen unterteilt werden. ASIC3 und TRPV1 sind pH-sensitive Ionenkanäle, welche eine mögliche Rolle bei der Nozizeption übernehmen könnten.

Die so gewonnenen Ergebnisse könnten eine Grundlage zur Entwicklung neuer medikamentös-therapeutischer Ansätze bei schmerzhaften Erkrankungen der Pleura darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuchsreihen wurden 7 Wistar-Ratten weiblichen Geschlechts (Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland) mit einem Gewicht zwischen 200 bis 260 g verwendet. Die Experimente wurden im Einklang mit der European Communities Council Directive vom 24. November 1986 (86/609/EEC) durchgeführt.

2.2 Tracerapplikation in den Pleuraspalt

Die Ratten wurden mit 500 µl des Inhalationsnarkotikums Forene präanästhesiert, welches in Form eines Aerosols in einer Kammer verabreicht wurde. Den nun sedierten Tieren wurde Atropin i.m. sowie Domitor und Ketavet i.p. injiziert (Tab. 3). Nach Eintritt der Narkosewirkung erfolgte die Intubation. Als Tubus diente eine 16 GA Kanüle (Becton/Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Die intraoperative Beatmung erfolgte durch einen Harvard Rodent Ventilator Modell G683 (Harvard Apparatus, South Natick, Massachusetts, USA) mit einem Hubvolumen von 1 ml/100 g KG (Körpergewicht), einer Atemfrequenz von 97/min und einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von 5 cm/H₂O.

Zur Eröffnung der Pleurahöhle wurde zunächst ein ca. 2 cm langer Hautschnitt über dem *M. serratus anterior sinister* geführt. Anschließend wurde dieser Muskel durchtrennt. Die hierdurch sichtbare Interkostalmuskulatur wurde ebenfalls inzidiert. Nun war die Lungenoberfläche durch den Interkostalraum (ICR) zu erkennen. Durch Beatmung ohne PEEP kollabierten die Lungen. In die linke Pleurahöhle wurden mit Hilfe einer 10-µl-Mikropipette (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) jeweils 2 µl des Tracers Dil (Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande) oberhalb und unterhalb der Inzision appliziert. Anschließend wurden die Tiere wieder mit PEEP beatmet. Die Schnitte durch die Interkostalmuskulatur und den *M. serratus anterior sinister* wurden ebenso wie der Hautschnitt mit einer 4-0 Vicryl-Naht (Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland) verschlossen.

Beendet wurde die Narkose 30 Minuten nach Narkoseeinleitung durch eine s.c. Injektion Antisedan (Tab. 3). Bis die Tiere bei vollem Bewusstsein waren, wurden sie durch Lagerung auf einer beheizbaren Platte vor Unterkühlung geschützt. Anschließend erfolgte eine Haltung bei ausreichendem Nahrungsangebot in einem Raum mit Tageslicht, sodass ein normaler Tag-/Nachtrhythmus gewährleistet war.

Pharmakon	Wirkstoff	Hersteller	Dosierung
Forene	Isofluran	Abbott (Wiesbaden, Deutschland)	500 µl/5 l Luft
Atropinsulfat	Atropin	Braun (Melsungen, Deutschland)	0,25 mg/kg
Domitor	Medetomidinhydrochlorid	Pfizer (Karlsruhe, Deutschland)	0,1 mg/kg
Ketavet	Ketaminhydrochlorid	Pharmacia + Upjohn (Erlangen, Deutschland)	90 mg/kg
Antisedan	Atipamezolhydrochlorid	Pfizer	0,5 mg/kg

Tab. 3: Verwendete Pharmaka.

2.3 Tracerapplikation in die Interkostalmuskulatur

Bei einer Ratte wurde der Tracer in den linken 6. ICM injiziert. Zunächst erfolgte eine Narkose mit Atropin, Rompun und Ketamin i.m. (Tab. 4). Bei dem anästhesierten Tier wurde ein Hautschnitt in Höhe des linken 6. ICRs gesetzt. Nun erfolgte die Freipräparation der 6. und 7. Rippe. In den *M. intercostalis* des 6. ICRs wurden 2 µl des Tracers mit einer 10-µl-Mikropipette (Hamilton) injiziert. Anschließend wurde der gesetzte Hautschnitt durch eine 3-0 Vicryl-Naht (Ethicon) verschlossen und die Ratte bis zu ihrem vollständigen Erwachen unter einer Wärmelampe vor Unterkühlung geschützt. In den folgenden Tagen wurde die Ratte unter den in 2.2 erwähnten Bedingungen gehalten.

Pharmakon	Wirkstoff	Hersteller	Dosierung
Atropinsulfat	Atropin	Braun (Melsungen, Deutschland)	0,05 mg/kg
Rompun	Xylazinhydrochlorid	BayerVital (Leverkusen, Deutschland)	12 mg/kg
Ketamin	Ketaminhydrochlorid	Inresa Arzneimittel GmbH (Freiburg, Deutschland)	80 mg/kg

Tab. 4: Verwendete Pharmaka.

2.4 Präparation und Perfusionsfixierung der Gewebe

Sechs Tage postoperativ erfolgte die Gewebeentnahme. Hierfür wurden die Versuchstiere solange dem Inhalationsnarkotikum Sevofluran (Sevofluran, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) ausgesetzt, bis keine Atemexkursionen mehr erkennbar

waren. Nun wurde der Thorax mit Hilfe eines beidseits ca. 0,5 cm parasternal geführten Schnittes eröffnet, wodurch die Lungen kollabierten. In den linken Ventrikel wurden zunächst 0,5 ml Heparin (Liquem, Roche, Mannheim, Deutschland) injiziert. Anschließend wurde der Ventrikel eröffnet und durch diesen ein Katheter in die Aorta thoracica vorgeschoben, durch den 200 ml Vorspüllösung plus 2 ml Heparin (Liquem) (Tab. 5) (Forssmann et al. 1977) und anschließend 500 ml Fixationslösung zur Perfusion verabreicht wurden. Als Fixationslösung wurde Zambonifixans (bei 2 Tieren) oder 4% Paraformaldehyd (PFA) (bei 3 Tieren und dem ICR-Tracing) verwendet (Tab. 5). Dann wurden die Tiere für eine Stunde bei 6 °C in einem Kühltank gelagert.

Hierauf folgte die Entnahme folgender Organe: Thoraxpaket (inkl. Trachea, Ösophagus, Thymus, Lungen und Herz), DRGs C2-L1 (beidseitig), Ggl. jugulare/nodosum (beidseitig), Ggl. stellatum (beidseitig, nur bei Pleuratracing), Rückenmarkssegmente C3-Th7 und jeweils die ICRs um die makroskopisch sichtbare Tracerapplikationsstelle. Bei einer Ratte wurden zusätzlich Anteile der vorderen Bauchwand, das Zwerchfell, die Harnblase, das DRG L4 (beidseitig), der ipsilaterale 7. ICR und der 5. ICR (beidseitig) entnommen: Von den Anteilen der vorderen Bauchwand, dem Zwerchfell, der Harnblase und Anteilen der ICRs wurden Quetschpräparate (*whole mounts*) angefertigt.

Die übrigen Gewebe wurden nach ihrer Entnahme mehrmals mit 0,1 M Phosphatpuffer (PP), pH 7,4 (Tab. 5) gespült und anschließend in 18 % saccharosehaltigem (Sigma, Steinheim, Deutschland) 0,1 M PP, pH 7,4, für 24 Stunden kryoprotectiert. Dann wurden die entnommenen Organe in Tissue Tek (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) auf Filterpapier eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Reagenz	Zusammensetzung
Vorspüllösung	2,5 % Polyvinylpyrrolidon (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,9 % NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,5 % Procainhydrochlorid (Merck), pH 7,4
Zambonifixans	2 % Paraformaldehyd (Merck) und 15% Pikrinsäure (Merck) in 0,1 M PP (s.u.)
4 % Paraformaldehyd (PFA)	4 % Paraformaldehyd (Merck) in 0,1 M PP (s.u.)
0,1 M Phosphatpuffer (PP)	15,6 g/l NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (Merck) + 17,8 g/l Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O (Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland), pH 7,4

Tab. 5: Chemikalien für die Perfusionsfixation.

2.5 Anfertigung der Gewebeschnitte

Mit einem Kryostaten (Jung Frigocut 2800E, Leica, Bensheim, Deutschland) wurden von den verschiedenen Organen 10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger (SuperFrost Plus, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) gezogen. Nach 30 Minuten Lufttrocknung konnten die Schnitte bis zur weiteren Verarbeitung im Gefrierschrank bei -20 °C zwischengelagert werden.

2.6 Immunfluoreszenz und Histochemie

Während der gesamten im Folgenden dargestellten Schritte wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur gelagert, um eine Austrocknung zu verhindern. Die durch das Pleuratracing markierten Spinalganglienneurone wurden ipsilateral der Tracerapplikationsstelle in Segmenthöhe Th3-Th6 inkubiert. Zusätzlich wurden bei einer Ratte Schnitte des ipsilateralen 4. ICRs mit einem Antikörper gegen das *rat endothelial cell antigen 1* (RECA1) behandelt (Tab. 6). Die Angabe *ipsilateral* bezieht sich in den folgenden Abschnitten immer auf die Seite der Tracerapplikation, welche beim Pleura- und ICR-Tracing stets links lag.

Vor der Inkubation der Schnitte mit den primären und anschließend den sekundären Antikörpern wurden diese mit einem Fettstift (Super PAP PEN, Immunotech, Marseille, Frankreich) umkreist und dann für eine Stunde mit einer Blocklösung zur

Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen behandelt. Die Blocklösung enthielt 0,2 % Tween 20, 0,1 % Rinderserum (BSA) und 10 % normales Schweineserum (NSS) in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, s. unten).

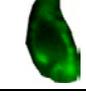
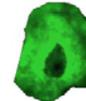
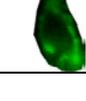
Die nun folgende Inkubation mit den primären Antikörpern (Tab. 6) erfolgte über Nacht. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils zehn Minuten mit PBS gewaschen, um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. PBS wurde mit 28,75 ml Lösung A (31,2 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Deutschland)) und 96,20 ml Lösung B (17,8 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland)) angesetzt. Danach wurden 22,4 g NaCl zugesetzt und auf 5 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

Im nächsten Schritt erfolgte eine weitere einstündige Inkubation mit den Sekundärantikörpern (Tab. 6), gefolgt von vier jeweils zehnminütigen Waschvorgängen mit PBS-Puffer.

In jedem Inkubationszyklus wurden bei einem DRG, welches keine Dil-positiven Neurone besaß, als Negativkontrolle auf unspezifische Bindung der Sekundärseren die Primärantikörper durch PBS + S (PBS-Puffer mit doppelter Salzkonzentration) ersetzt.

Eine Verdünnung der Primär- und Sekundärantikörper erfolgte mit PBS + S.

Zuletzt wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit Carbonat-gepuffertem Glycerol (pH 8,6) und einem Deckgläschen (R. Langenbrinck, Emmendingen, BRD) eingedeckelt.

Antigen		Hersteller	Wirtsspezies	Verdünnung
<i>Primäre Antikörper</i>				
ASIC3		Chemicon (Hofheim, Deutschland)	Meerschweinchen polyklonal	1:200
TRPV1 (VR1)		Chemicon	Kaninchen polyklonal	1:2000
NF68		Sigma (Steinheim, Deutschland)	Maus Klon NR4	1:200
RECA1		Serotec (Oxford, Groß- britannien)	Maus Klon 87.6E4	1:20
<i>Sekundäre Antikörper</i>				
Antigen/Konjugat		Hersteller	Wirtsspezies	Verdünnung
Meerschweinchen-Ig <i>FITC</i>		Dianova (Hamburg, Deutschland)	Esel	1:100
Kaninchen-Ig <i>Cy5</i>		Dianova	Esel	1:50
Maus-Ig <i>AMCA</i>		Dianova	Esel	1:50
Maus-Ig <i>FITC</i>		Dianova	Esel	1:200

Tab. 6: Primär- und Sekundär-Antikörper. FITC = Fluoresceinisothiocyanat, Cy5 = Indodicarbocyanin, AMCA = Aminomethyl-Coumarin-Acetat, Ig = Immunglobulin.

2.7 Auswertung

In der vorliegenden Arbeit fand das Verfahren einer Vierfach-Fluoreszenz Anwendung. Die Absorptions- und Emissionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe finden sich in Tabelle 7.

Die angefertigten Schnitte wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 Imaging, Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet. Mit Hilfe von vier verschiedenen Filtern (Tab. 7) konnte zwischen den unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen unterschieden werden.

Bevor die angefertigten Gewebeschnitte mit Antikörpern inkubiert wurden, mussten die Dil-positiven Zellen dokumentiert werden, da der Farbstoff Dil in den folgenden Inkubationsschritten teilweise ausgespült wurde. Hierbei wurden auch gleichzeitig die

Zellgrößen ausgemessen und festgehalten. Ausgemessen und inkubiert wurden nur Schnittebenen, auf denen die retrograd-markierten Neurone mit ihrem Zellkern angeschnitten waren. War der Zellkern einer Zelle in zwei Schnittebenen dargestellt, wurde er nur einmal ausgewertet. Die Dokumentation erfolgte mit einer Digitalkamera (Model No. DXC-390P, BCCD Color Video Camera, Sony, Japan). Die Bilder wurden mit dem Programm Axio Vision (Zeiss, Jena, BRD) auf einem Computer gespeichert. Nun erfolgte die Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern. Anschließend wurden die vorher dokumentierten Dil-positiven Zellen mit dem Mikroskop wieder aufgesucht und durch Verwendung der verschiedenen Fluoreszenzfilter für den Tracer und die unterschiedlichen Antikörperkombinationen fotografiert und quantitativ dokumentiert.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem Chi²-Test und *Fisher's exaktem Test*. Bei der Testung durch *Fisher's exakten Text* wurde zur Korrektur des Signifikanzniveaus α bei multiplem Testen eine Benferroni-Korrektur angewandt. Die statistischen Tests wurden mit Hilfe eines Statistikprogramms durchgeführt (Statxact, Cytel Inc., Cambridge, USA).

FF	Ab	Em	AF	SF	Hersteller
Dil	549	565	530-560	572,5-647,5	AHF, Tübingen, Deutschland
FITC	494	518	460-500	512-542	AHF
Cy5	643	667	590-650	662,5-737,5	AHF
AMCA	353	442	340-380	435-685	AHF

Tab. 7: Filter für die Fluoreszenzmikroskopie. **FF** = Fluoreszenzfarbstoff, **Ab** = Absorptionsmaximum, **Em** = Emissionsmaximum, **AF** = Anregungsfilter, **SF** = Sperrfilter, alle Angaben in nm.

2.8 Zusammenfassung

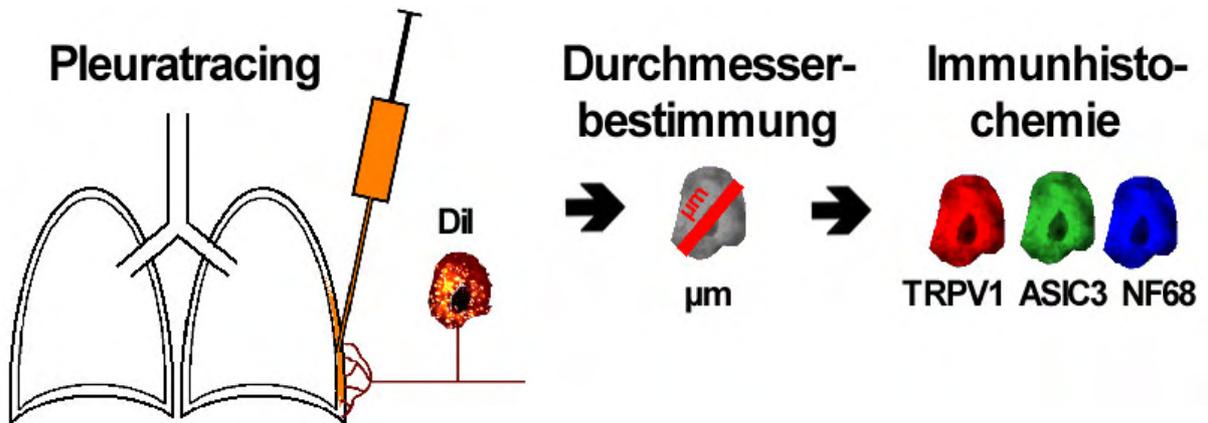


Abb. 8: Zusammenfassung des Versuchsaufbaus: Der Tracer Dil wurde in den Pleuraspalt appliziert. Durch den Tracer markierte DRGs wurden identifiziert und ihr Durchmesser wurde bestimmt. Anschließend wurden die markierten Neurone auf Immunreaktivität bzgl. ASIC3, TRPV1 und NF68 untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Verteilung des Tracerfarbstoffes nach pleuraler Applikation

3.1.1 Tracerverteilung am Applikationsort

Nachdem die Lungen für kurze Zeit durch Unterbrechung des PEEP zum Kollabieren gebracht wurden, wurde der Tracer Dil in den linken Pleuraspalt appliziert. An einer 40 Minuten nach der Tracerapplikation verstorbenen Ratte wurde die Verteilung des Tracerfarbstoffes unmittelbar untersucht. Nachdem der Thorax eröffnet und der linke Lungenflügel entfernt wurde, konnte der Tracer auf der kostalen Pleura parietalis sinistra makroskopisch lokalisiert werden. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich der Farbstoff nicht über die an den 4. ICR angrenzenden Rippen ausgebreitet.

Bei den anderen Ratten, welche sechs Tage nach der Tracerapplikation getötet und untersucht wurden, war die makroskopische Lokalisation des Tracerfarbstoffes ebenfalls unverändert. Es konnten Tracerspuren jeweils auf der kostalen Pleura parietalis sinistra in Höhe der ICRs 3-6 beobachtet werden (Abb. 9). Lediglich ein Tier (Ratte 5) wies zusätzlich eine größere Tracermenge auf der Oberfläche der linken Lunge auf.

Mikroskopisch zeigte sich auf Querschnitten durch die ICRs in Höhe der Tracerapplikationsstelle eine Entzündungsreaktion der Pleura parietalis mit hochgradiger Traceranreicherung (Abb. 10). Dil-positive makrophagenähnliche Strukturen waren sowohl in der entzündlich verdickten Pleura parietalis als auch - in geringerer Anzahl - in den pleuranahen Anteilen der Interkostalmuskulatur zu entdecken. Die Pleura parietalis der ICRs, welche um die Tracerapplikationsstelle entnommen wurde, wies mit zunehmender Entfernung von dieser Stelle eine Abnahme der pleuralen Entzündungsreaktion auf.

Bei zwei Tieren (Ratte 1 und 2) wurden Quetschpräparate vom ipsilateralen 7. ICR und Anteilen des 5. ICRs beider Seiten angefertigt. In allen Präparaten konnten Tracerspuren nachgewiesen werden. Sofern dies auf Grund des hohen Gewebedurchmessers der Quetschpräparate zu beurteilen war, stellten sich teilweise gefäßähnliche Strukturen dar (s. auch 3.1.2).

Querschnitte durch den ipsilateralen 7. ICR wiesen ebenfalls Dil-positive gefäßähnliche Strukturen auf. Diese Strukturen zeigten Immunreaktivität für RECA1 (Abb. 11).

Die präparierten Thoraxpakete zeigten bei allen Ratten mikroskopisch eine Traceranreicherung auf der dorsokostalen Lungenoberfläche der ipsilateralen Lunge. Dieses entsprach dem Anteil der Lungenoberfläche, welcher in vivo der Tracerapplikationsstelle benachbart war. Auf der Lungenoberfläche blieb die Traceranreicherung auf die Pleura visceralis beschränkt (Abb. 12). Im Lungenparenchym waren nur vereinzelt Dil-positive makrophagenähnliche Strukturen überwiegend in der Nähe der Tracer-markierten Pleura visceralis zu erkennen. Die kontralaterale Lungenoberfläche wies zum größten Teil keine Tracermarkierung auf (Abb. 13). Lediglich einzelne, größtenteils dorsal gelegene Anteile, zeigten Dil-positive Bereiche der viszeralen Pleura (Abb. 14).

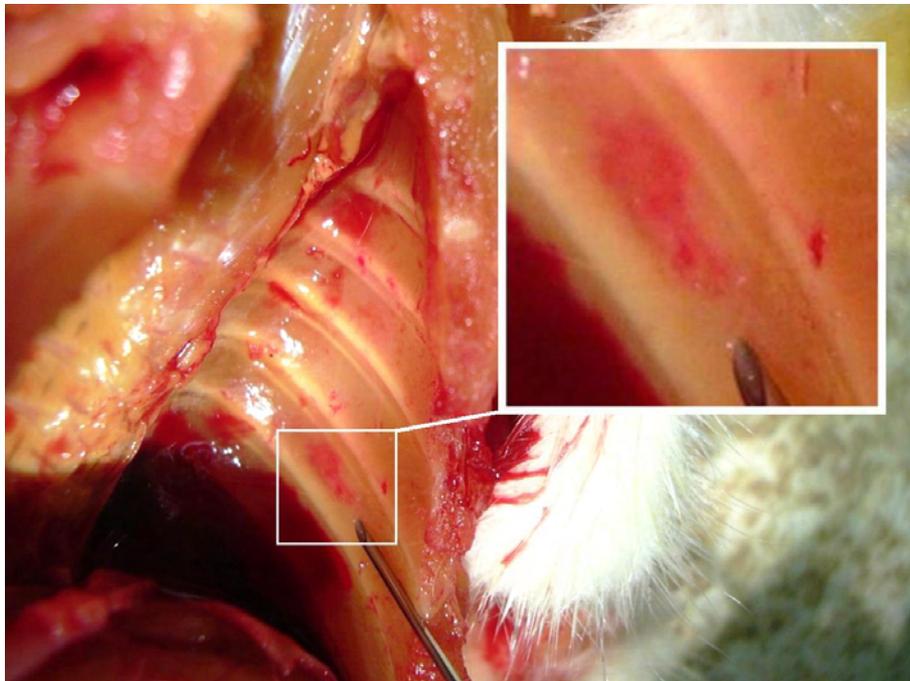


Abb. 9: Der Tracer Dil ist makroskopisch auf der kostalen Pleura parietalis sinistra zu erkennen.

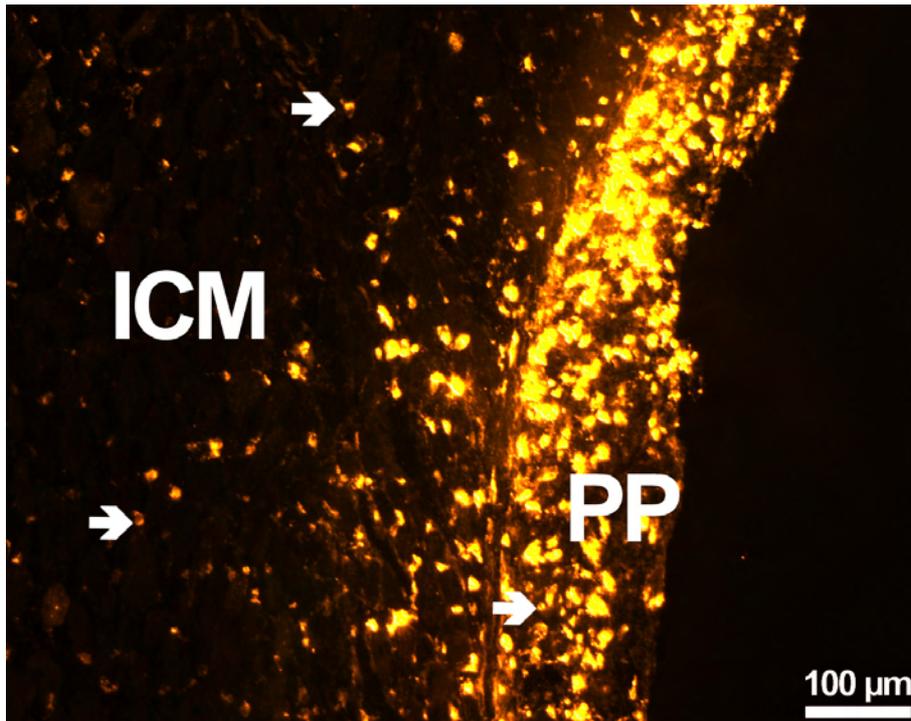


Abb. 10: In Höhe der Tracerapplikationsstelle zeigt sich eine entzündlich verdickte Pleura parietalis (PP). Makrophagenähnliche Strukturen (➔) sind sowohl in der verdickten PP als auch im Interkostalmuskel (ICM) zu erkennen.

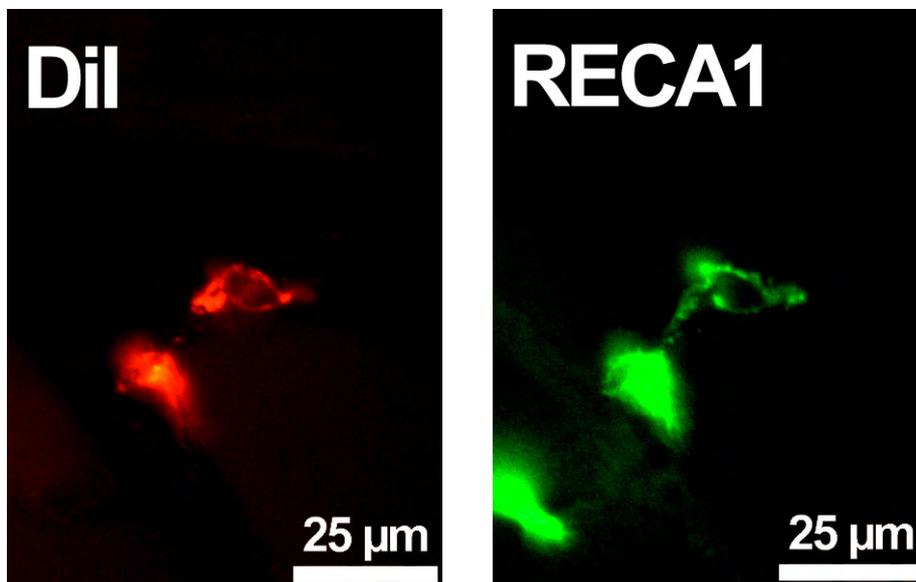


Abb. 11: Querschnitt durch den ipsilateralen Interkostalmuskel in Höhe Th4. Es sind Dil-positive, gefäßähnliche Strukturen zu erkennen, die durch den Panendothelmarker RECA1 markiert werden.

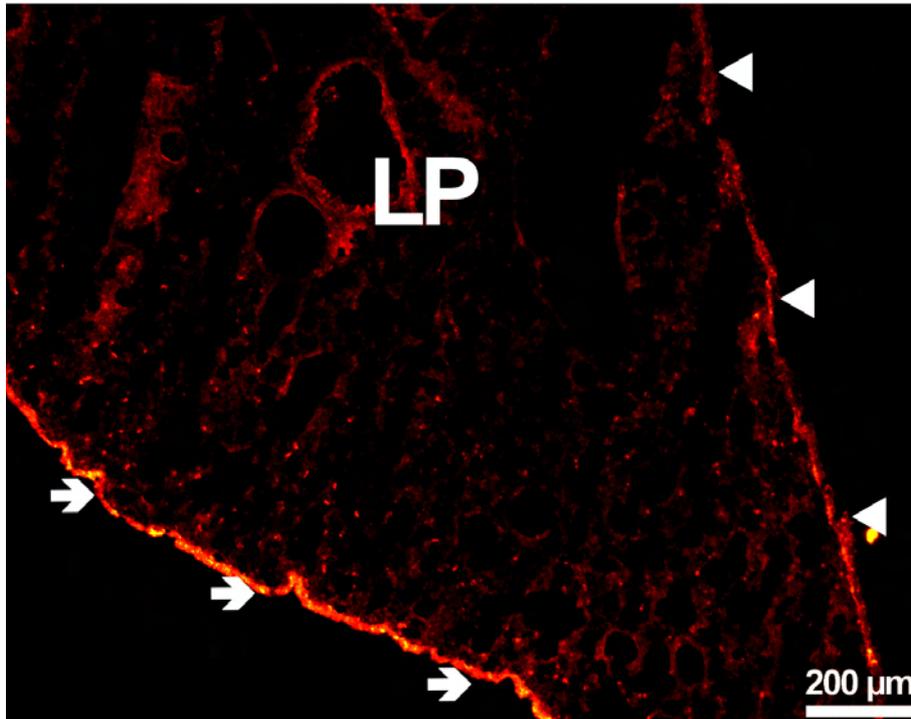


Abb. 12: Dargestellt ist ein Querschnitt durch die ipsilaterale Lunge. Die dorsokostale Pleura visceralis (→) zeigt gegenüber der mediastinalen Pleura visceralis (◄) eine deutliche Traceranreicherung. Das Lungenparenchym (LP) zeigt sich tracerfrei.

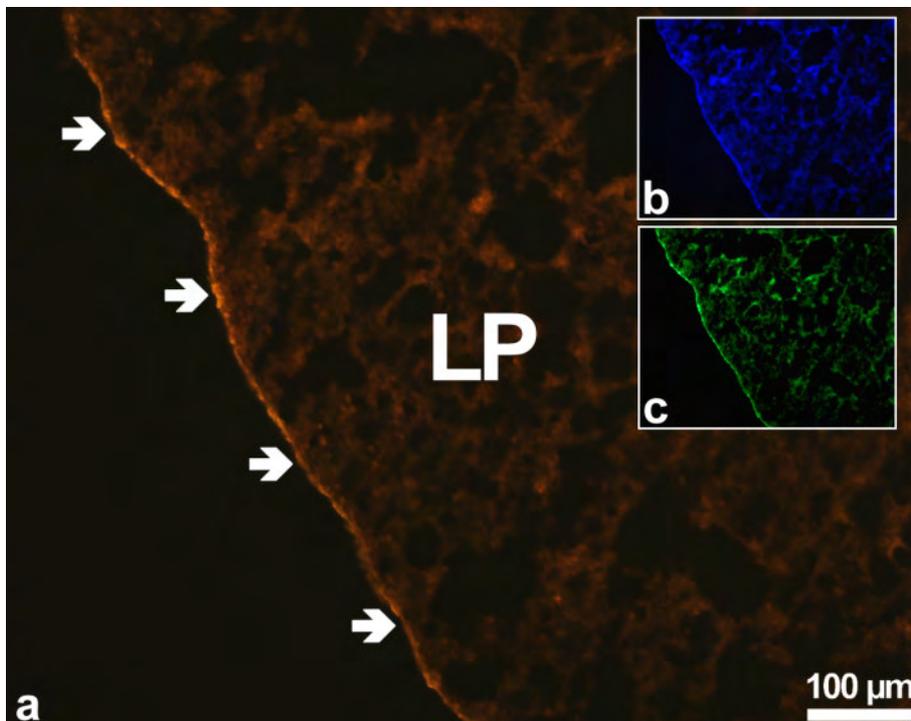


Abb. 13: Ein Querschnitt durch die kontralaterale Lunge lässt keine Tracerspuren in Lungenparenchym (LP) oder Pleura visceralis (→) erkennen (a). Die Pleura visceralis zeigt leichte Autofluoreszenz. Vergleiche hierzu die Aufnahmen im AMCA- (b) und FITC-Filter (c).

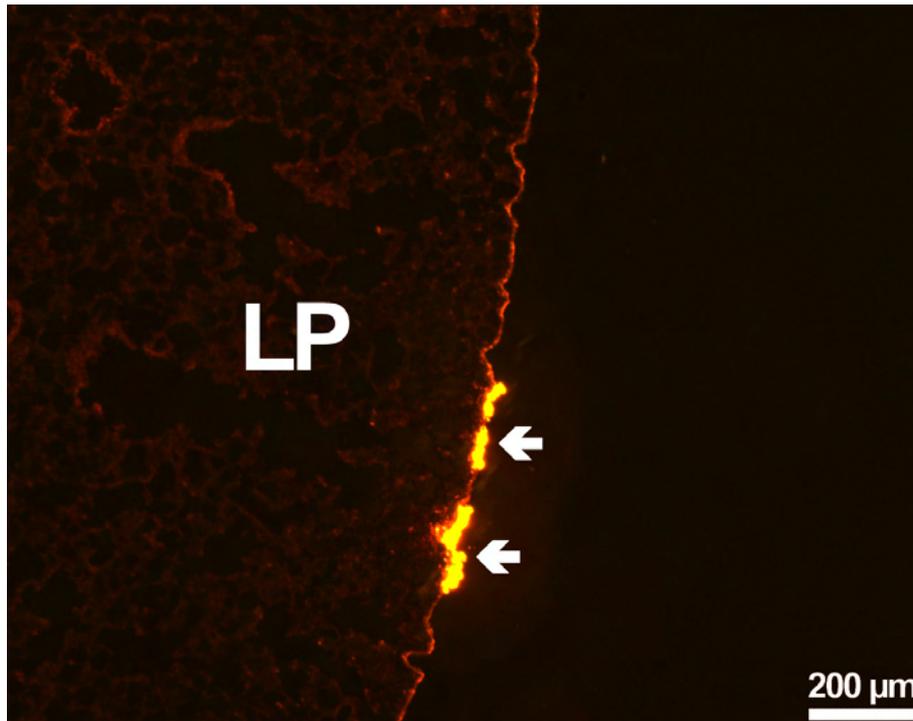


Abb. 14: Vereinzelt zeigt die Pleura visceralis (↔) der kontralateralen Lunge Traceranreicherung. Das Lungenparenchym (LP) präsentiert sich tracerfrei.

3.1.2 Tracerverteilung in applikationsfernen Organen

Das Epikard (Lamina visceralis pericardii) präsentierte sich bei allen Ratten zum überwiegenden Anteil tracerfrei (Abb. 15). Lediglich vereinzelte Bezirke wiesen Tracer auf (Abb. 16).

In weiteren Organen des Thoraxpaketes, wie Thymus oder Ösophagus, konnten makrophagen- und gefäßähnliche Strukturen im Parenchym bzw. subepithelial und intramuskulär beobachtet werden (Abb. 17 u. 18).

Bei den zwei in 3.1.1 erwähnten Tieren (Ratte 1 u. 2) wurden während der Präparation weitere Quetschpräparate von Anteilen der vorderen Bauchwand, dem Zwerchfell und der Harnblase angefertigt. Auch in diesen Präparaten konnten Tracerspuren nachgewiesen werden, die sich ebenfalls wieder, sofern auf Grund des hohen Gewebedurchmessers der Quetschpräparate zu beurteilen, als gefäßähnliche Strukturen darstellten (Abb. 19).

In den entnommenen Rückenmarkssegmenten C3-Th7 konnte kein Tracer in Motoneuronen nachgewiesen werden (Abb. 20).

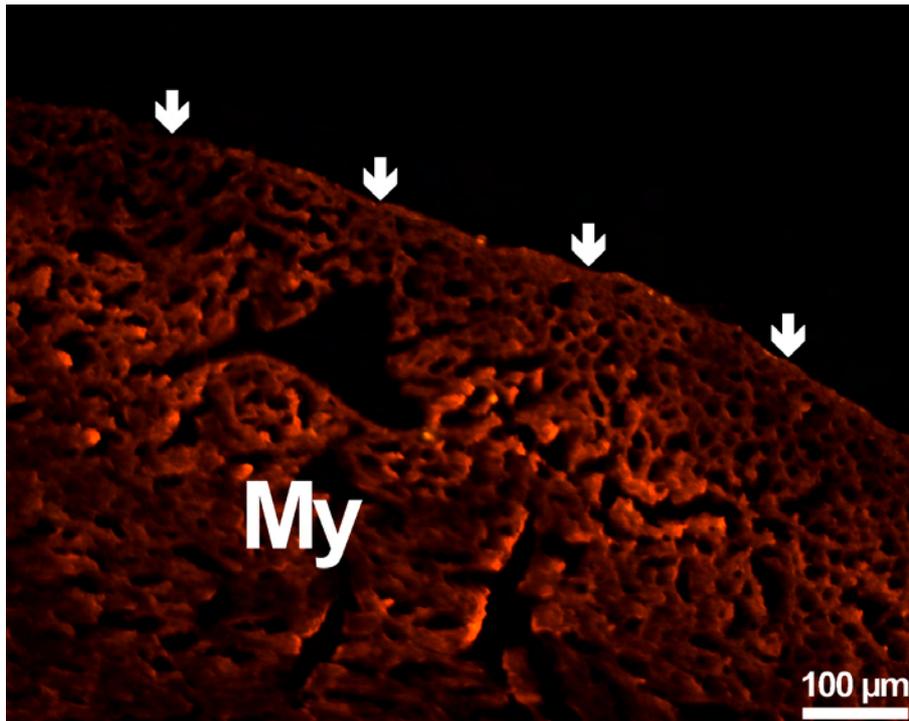


Abb. 15: Das Epikard (↓) und das Myokard (My) zeigen keine Tracerspuren.

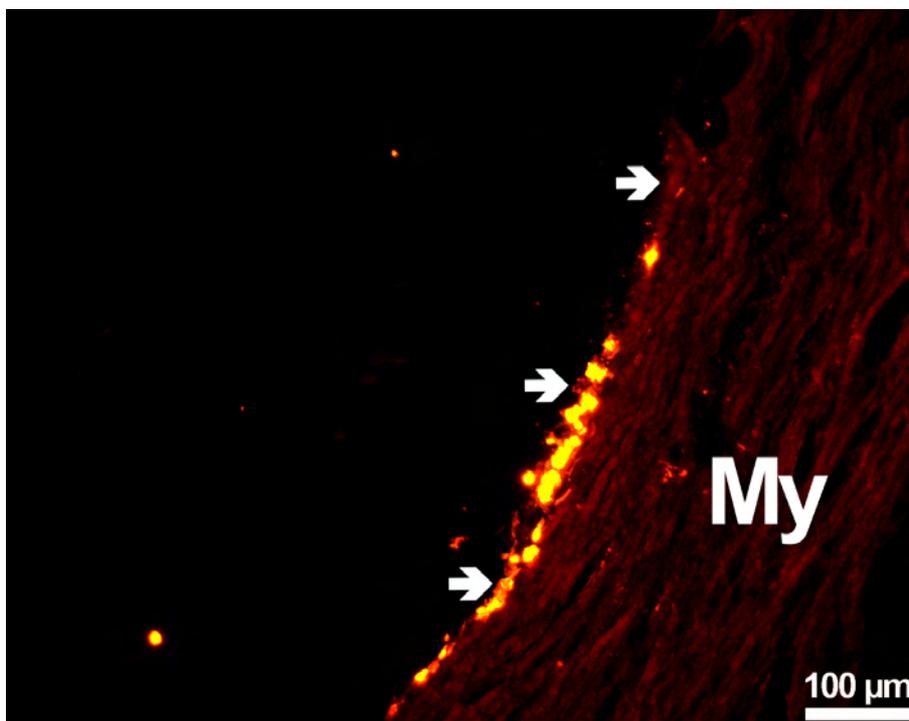


Abb. 16: An vereinzelten Stellen zeigt das Epikard (→) Dil-Anreicherung. Das Myokard (My) weist keine Dil-Spuren auf.

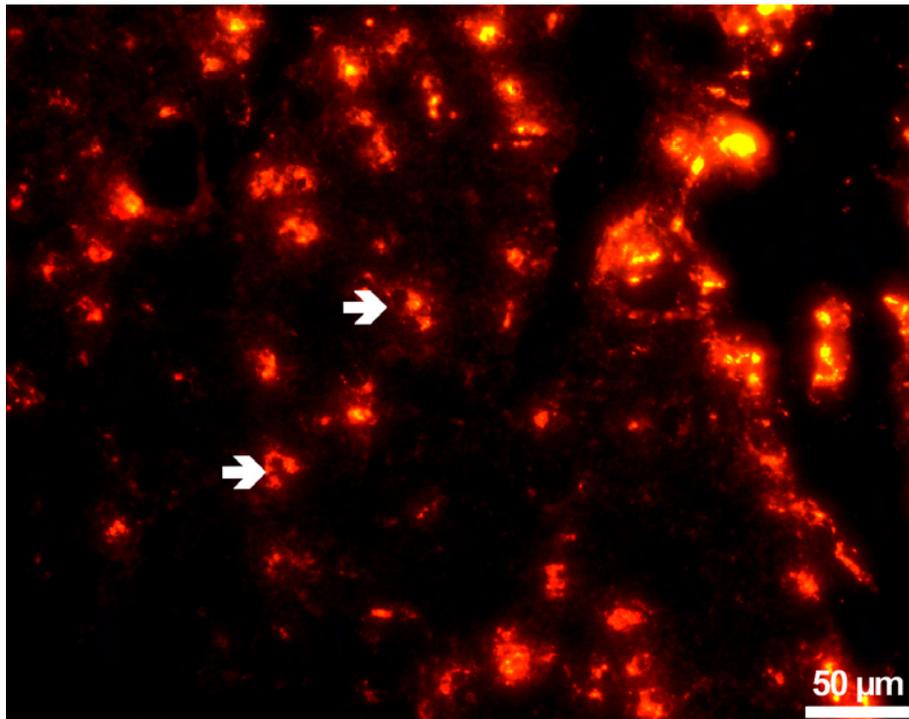


Abb. 17: Makrophagenähnliche (➔) Dil-positive Strukturen im Parenchym des Thymus.



Abb. 18: Querschnitt durch den Ösophagus mit makrophagen- und gefäßähnlichen Strukturen in der Submucosa (SM) und Muscularis (Mu). Das Epithel (E) weist Autofluoreszenz auf.

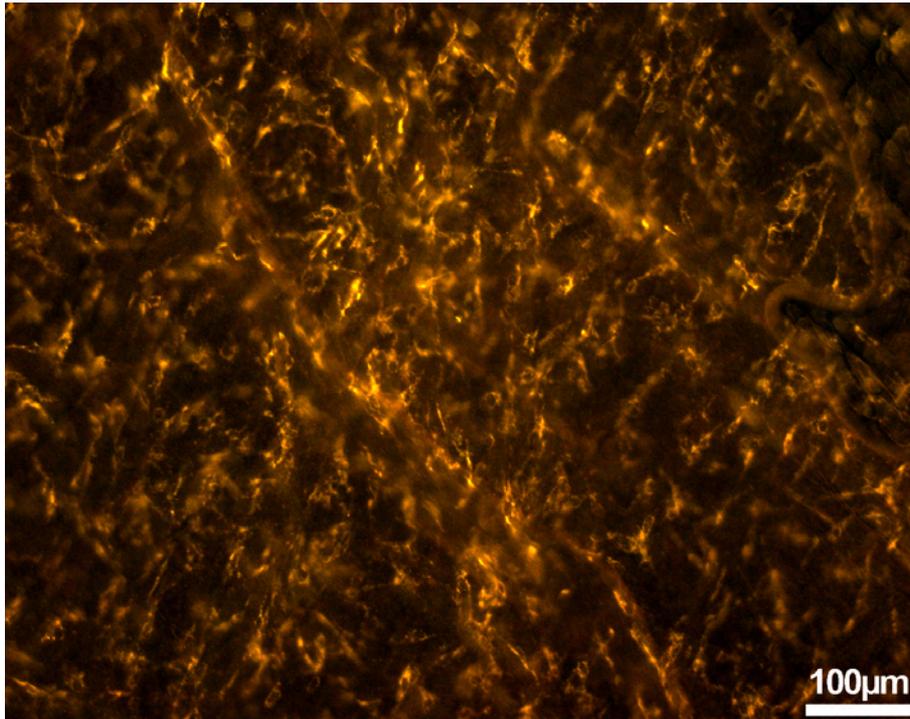


Abb. 19: Quetschpräparat der Harnblase mit kapillarähnlichen Strukturen.

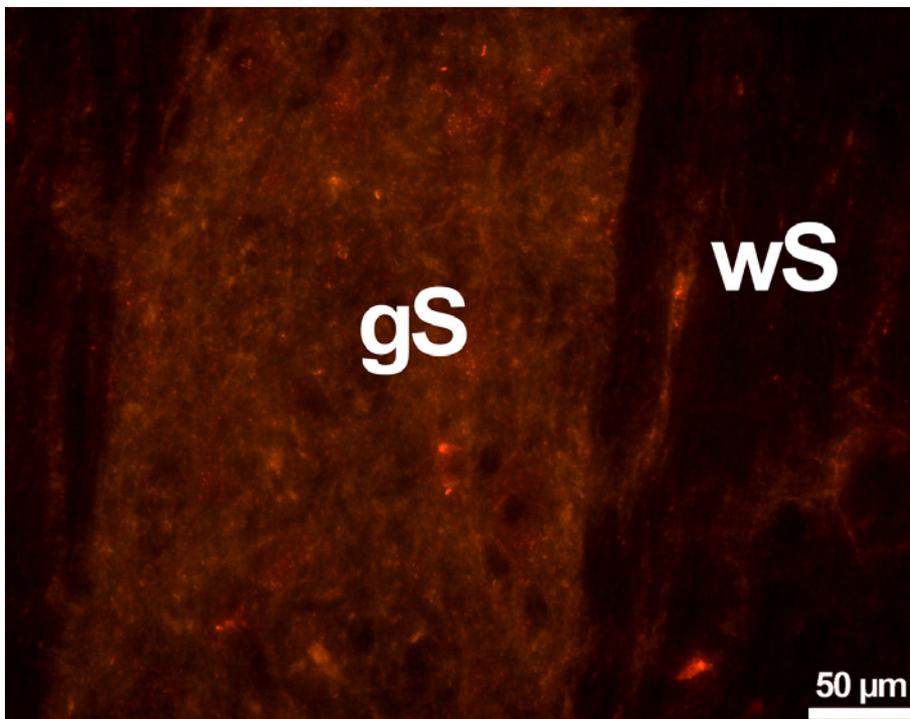


Abb. 20: Längsschnitt durch das Vorderhorn des Rückenmarks. Es sind keine Dil-positiven Motoneurone zu erkennen. gS = graue Substanz, wS = weiße Substanz.

3.1.3 Dil-positive Neurone in den Ganglia jugulare et nodosum

Bei allen Tieren konnten Dil-markierte Neurone in den ipsi- und kontralateralen Ganglia jugulare et nodosum nachgewiesen werden (Tab. 8 u. Abb. 21). Mit insgesamt 67 % war der Anteil der markierten Neurone auf der ipsilateralen Seite höher als auf der kontralateralen.

Von insgesamt 679 Dil-markierten Neuronen (DRGs von C2-L1 und Ganglia jugulare et nodosum) waren 100 (14,7 %) in den Ganglia jugulare et nodosum lokalisiert.

	Ratte 1		Ratte 2		Ratte 3		Ratte 4		Ratte 5		Σ	
	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%	N	%
Links	13	65	12	66,7	7	70	12	57,1	23	74,2	67	67
Rechts	7	35	6	33,3	3	30	9	42,9	8	25,8	33	33
Σ	20	100	18	100	10	100	21	100	31	100	100	100

Tab. 8: Dil-positive Neurone im Ggl. jugulare/nodosum.

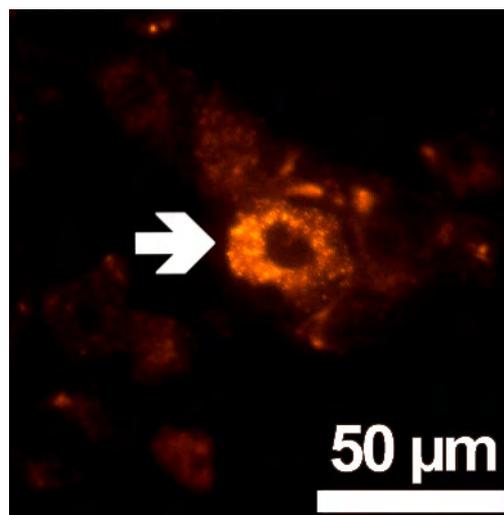


Abb. 21: Dil-positives Neuron (➔) im Ganglion jugulare/nodosum.

3.1.4 Segmentale Verteilung des Tracers in DRG-Neuronen

Bei der segmentalen Verteilung des Tracers in DRG-Neuronen fiel zunächst auf, dass ein Großteil der Dil-markierten Neurone sowohl ipsi- als auch kontralateral zwischen Segmenthöhe C4 und C6 und Th1 und Th7 lokalisiert war (Tab. 9 u. 10).

Ipsilateral war mit >20 % pro Tier der größte Anteil retrograd markierter Neurone in den DRGs der Segmente Th4-Th6 lokalisiert. Die Ratte 4 wies trotz nicht ausgewertetem DRG in Segmenthöhe Th5 sogar einen Anteil >60 % auf.

Kontralateral war der größte Anteil retrograd markierter Neurone, welcher ebenfalls >20 % pro Tier betrug, zwischen Th3 und Th5 lokalisiert.

Die Gesamtzahl retrograd markierter Neurone in den ipsilateralen DRGs jeder Ratte variierte zwischen 31 und 108, die der kontralateralen zwischen 17 und 82. Bei den meisten Tieren konnten linksseitig, also ipsilateral der Tracerapplikationsstelle, mehr Dil-positive Neurone gefunden werden als kontralateral. Zwischen den einzelnen Versuchstieren stellten sich jedoch erhebliche Unterschiede dar: So wies Ratte 2 ipsilateral viermal mehr retrograd markierte Neurone auf als kontralateral, bei Ratte 4 hingegen konnte keine Seitendifferenz festgestellt werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass bei Ratte 4 auf der ipsilateralen Seite die DRGs in Segmenthöhe C2 und Th5 nicht ausgewertet werden konnten. Im Mittel waren ipsilateral doppelt so viele Neurone markiert wie kontralateral.

Die Höhe des ICRs, in welchen der Tracerfarbstoff appliziert wurde, entsprach bei jedem Tier der Höhe des DRGs auf der ipsilateralen Seite mit der größten Anzahl an Dil-positiven Neuronen. Abb. 22 zeigt die relative Anzahl retrograd markierter Neurone in diesen DRGs und den zwei jeweils kranial und kaudal benachbarten DRGs. Die Ratte 4 wurde in Abb. 22 nicht berücksichtigt, da das DRG der Segmenthöhe Th5 auf der ipsilateralen Seite nicht ausgewertet werden konnte.

	Ratte 1		Ratte 2		Ratte 3		Ratte 4		Ratte 5	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
C2	3	2,8	0	0	0	0	X	X	X	X
C3	0	0	0	0	0	0	1	3,2	0	0
C4	3	2,8	7	7,6	4	4,7	0	0	0	0
C5	17	15,7	5	5,4	14	16,3	0	0	12	23,5
C6	0	0	3	3,3	4	4,7	6	19,4	0	0
C7	1	0,9	0	0	0	0	1	3,2	1	2,0
C8	0	0	5	5,4	0	0	0	0	3	5,9
Th1	12	11,1	18	19,6	5	5,8	0	0	0	0
Th2	13	12,0	4	4,4	2	2,3	1	3,2	6	11,8
Th3	7	6,5	8	8,7	1	1,2	4	12,9	3	5,9
Th4	24	22,2	5	5,4	5	5,8	3	9,7	3	5,9
Th5	8	7,4	26	28,3	2	2,3	X	X	2	3,9
Th6	2	1,9	0	0	22	25,6	12	38,7	11	21,6
Th7	5	4,6	3	3,3	6	7,0	2	6,5	7	13,7
Th8	4	3,7	2	2,2	4	4,7	0	0	2	3,9
Th9	0	0	6	6,5	5	5,8	0	0	0	0
Th10	0	0	0	0	4	4,7	1	3,2	1	2,0
Th11	4	3,7	0	0	4	4,7	0	0	0	0
Th12	5	4,6	0	0	4	4,7	0	0	0	0
L1	0	0	0	0	X	X	0	0	0	0
Σ	108	100	92	100	86	100	31	100	51	100

Tab. 9: Anzahl Dil-markierter Neurone in den ipsilateralen DRGs. X = DRG nicht auswertbar.

	Ratte 1		Ratte 2		Ratte 3		Ratte 4		Ratte 5	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
C2	3	3,7	0	0	0	0	0	0	1	5,9
C3	0	0	0	0	2	3,5	2	6,5	0	0
C4	3	3,7	0	0	2	3,5	0	0	2	11,8
C5	7	8,5	1	4,4	7	12,1	0	0	1	5,9
C6	7	8,5	0	0	3	5,2	3	9,7	0	0
C7	1	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0
C8	0	0	1	4,4	0	0	0	0	0	0
Th1	18	22,0	5	21,7	8	13,8	0	0	0	0
Th2	8	9,8	4	17,4	11	19,0	0	0	0	0
Th3	3	3,7	2	8,7	14	24,1	5	16,1	0	0
Th4	25	30,5	8	34,8	1	1,7	1	3,2	3	17,7
Th5	2	2,4	0	0	0	0	10	32,3	8	47,1
Th6	0	0	0	0	3	5,2	3	9,7	2	11,8
Th7	0	0	1	4,4	1	1,7	6	19,4	0	0
Th8	1	1,2	1	4,4	0	0	1	3,2	0	0
Th9	1	1,2	0	0	1	1,7	0	0	0	0
Th10	0	0	0	0	3	5,2	0	0	0	0
Th11	2	2,4	0	0	2	3,5	0	0	0	0
Th12	1	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0
L1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Σ	82	100	23	100	58	100	31	100	17	100

Tab. 10: Anzahl Dil-markierter Neurone in den kontralateralen DRGs.

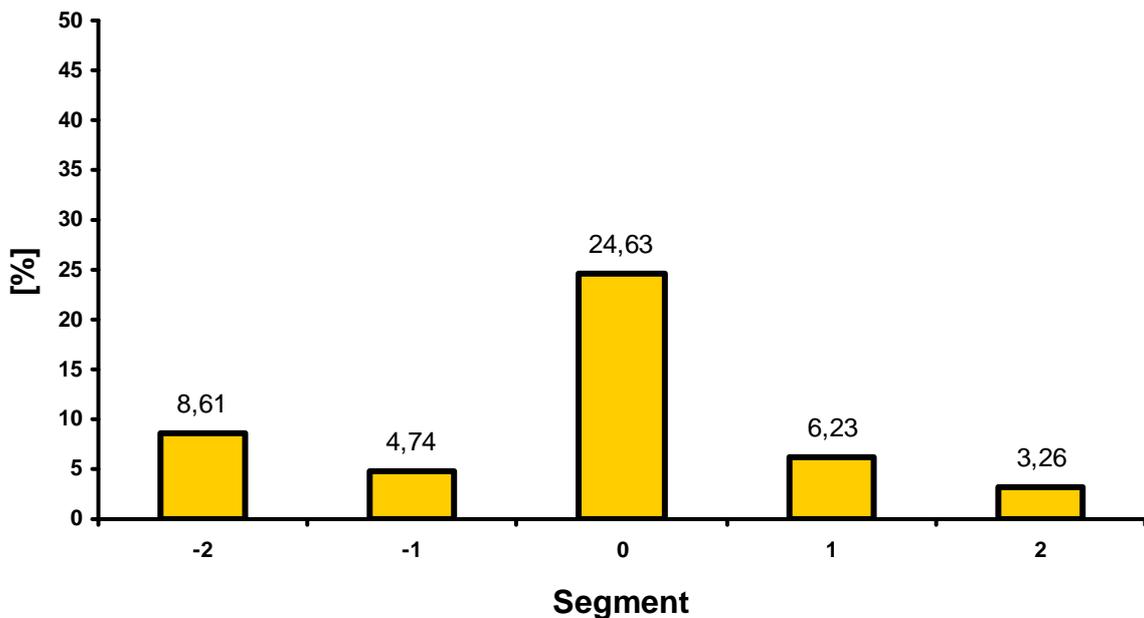


Abb. 22: Relativer Anteil Dil-positiver Neurone an der Gesamtzahl retrograd markierter DRG-Neurone in dem DRG, welches der Höhe des ICRs der Tracerapplikationsstelle entspricht (Segment 0) und den zwei jeweils kranial (-) und kaudal (ohne Vorzeichen) davon gelegenen DRGs (n=160 aus 4 Tieren).

3.1.5 Perikaryondurchmesser der ipsilateralen DRG-Neurone zwischen Th3-Th6

Tab. 11 und Abb. 23 stellen die Verteilung der ipsilateralen Dil-positiven DRG-Neurone bzgl. ihres Perikaryondurchmessers dar. Der größte Anteil der retrograd-markierten Neurone wies eine Größe zwischen 20-25 μm auf. Mit steigendem Durchmesser nahm die Zellzahl ab.

	Anzahl	%
<20 μm	14	9,46
20-25 μm	56	37,84
25-30 μm	45	30,41
30-35 μm	22	14,86
35-40 μm	6	4,05
40-45 μm	5	3,38

Tab. 11: Perikaryadurchmesser der ipsilateralen DRG-Neurone Th3-Th6 (n=148 aus 5 Tieren).

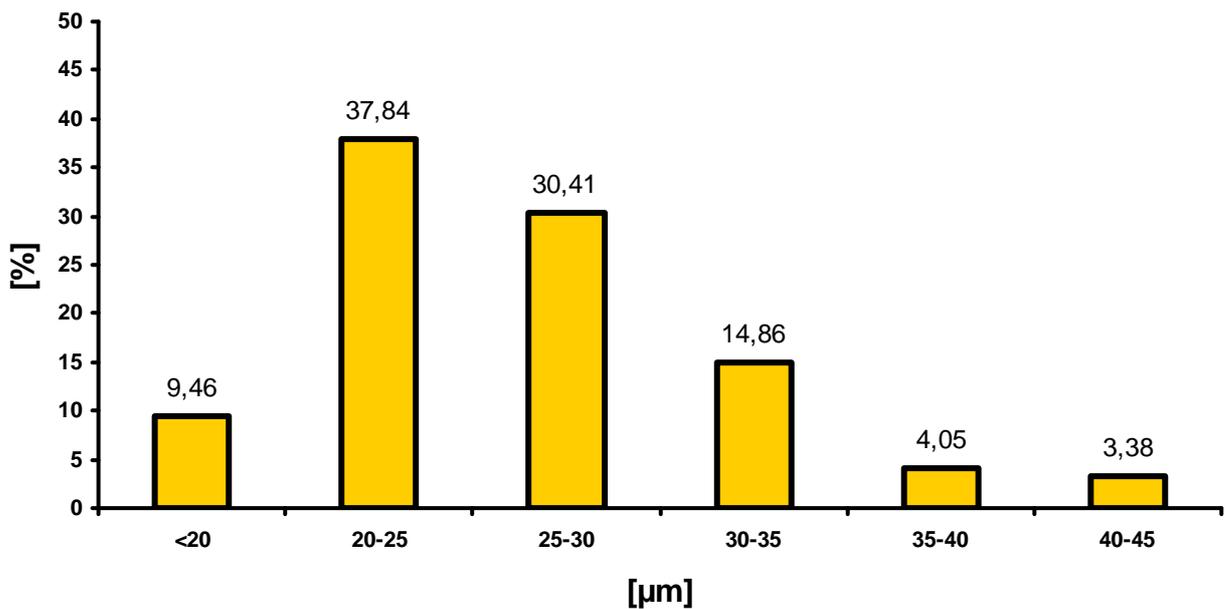


Abb. 23: Prozentuale Größenverteilung der ipsilateralen Dil-positiven DRG-Neurone Th3-Th6 (n=148 aus 5 Tieren).

3.2 Tracerapplikation in den 6. Interkostalmuskel

3.2.1 Verteilung des Tracers

Während der Entnahme des ipsilateralen 6. ICR war der Tracer unter Beleuchtung mit einer hellen Lichtquelle in der Interkostalmuskulatur zu erkennen. Eine Lokalisation außerhalb des ICMs war nicht sichtbar.

Querschnitte durch den 6. ICR ließen den Einstichkanal und die Tracerapplikationsstelle erkennen (Abb. 24). Auf Querschnitten, welche von dem Thoraxpaket angefertigt wurden, ließen sich in keinem Organ Tracerspuren erkennen (Abb. 25). In Rückenmarkshöhe Th5-Th8 waren einige Motoneurone Dil-positiv (Abb. 26).

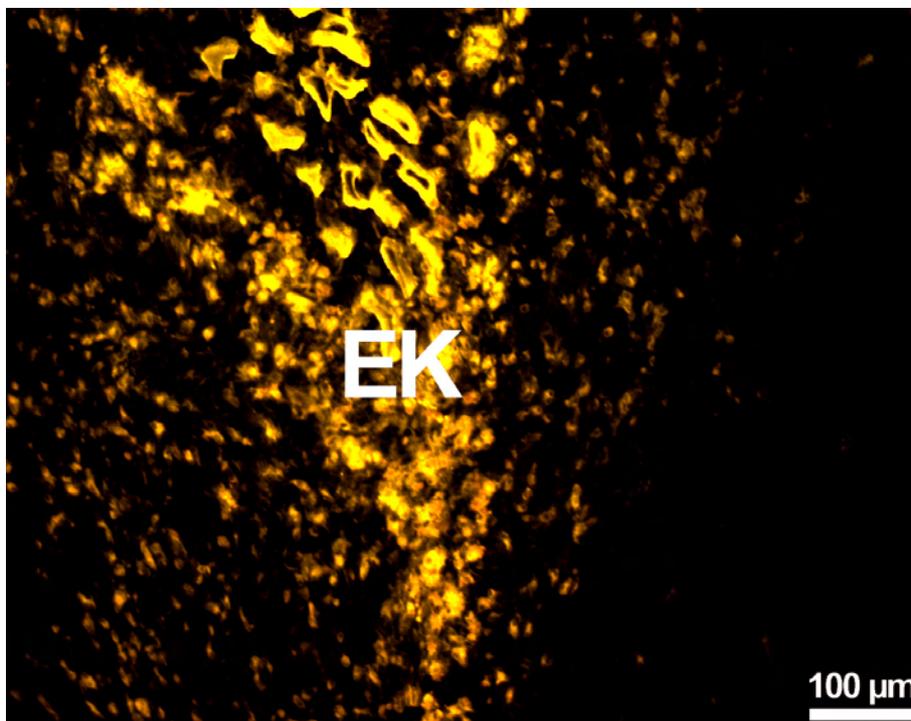


Abb. 24: Querschnitt durch den linken 6. ICR. Innerhalb der Interkostalmuskulatur lässt sich eine Traceranreicherung im Einstichkanal (EK) erkennen.

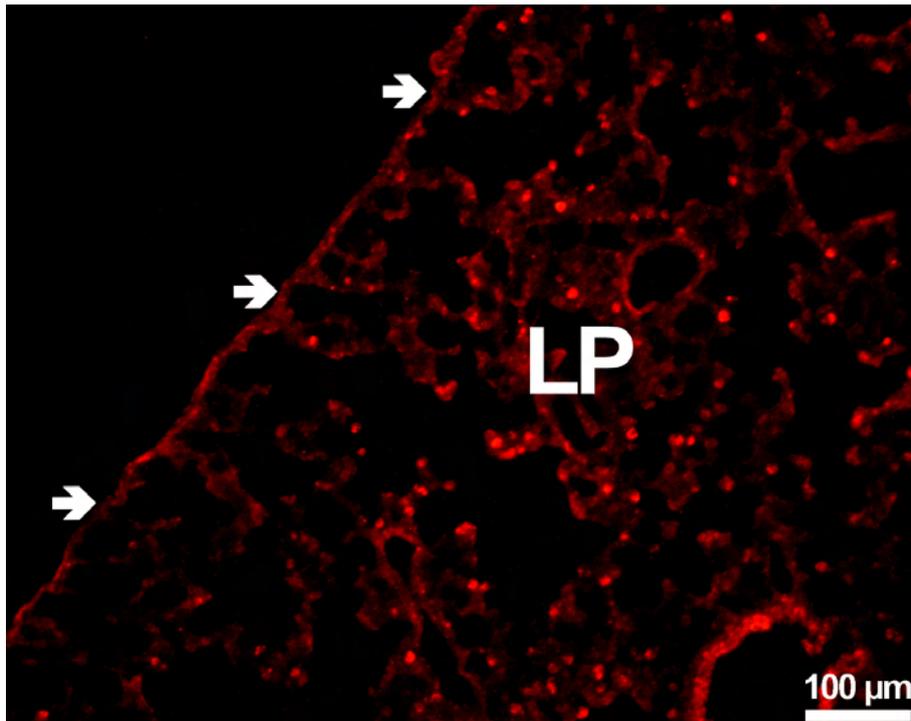


Abb. 25: Weder die Pleura visceralis (➔), noch das Lungenparenchym (LP) zeigen Tracerspuren. Lediglich das Bronchialepithel und einzelne Parenchymzellen weisen leichte Autofluoreszenz auf.

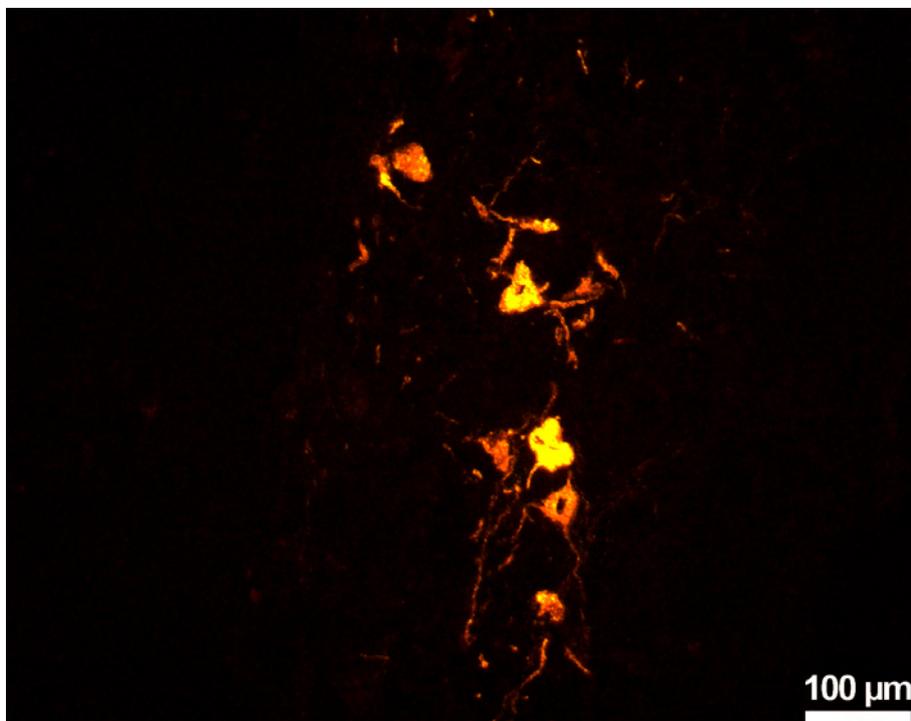


Abb. 26: Dil-positive Motoneurone in Rückenmarkshöhe Th5-Th8.

3.2.2 Dil-positive Neurone in den Ganglia jugulare et nodosum

In den Ganglia jugulare et nodosum konnten keine Dil-positiven Neurone nachgewiesen werden.

3.2.3 Segmentale Verteilung des Tracers in DRG-Neuronen

Die segmentale Verteilung Dil-positiver DRG-Neurone in Höhe C2-L1 ist in Tab. 12 und Abb. 27 dargestellt. Es zeigte sich, dass Dil-positive Neurone streng auf die ipsilaterale Seite der Tracerapplikation beschränkt waren. Mit 82,2 % wies das DRG in Segmenthöhe Th6 auf der ipsilateralen Seite den größten Anteil retrograd markierter Neurone auf (Abb. 28). Diese Segmenthöhe entsprach der ICR-Höhe der Tracerapplikation.

	links		rechts	
	n	%	n	%
C2	0	0	0	0
C3	0	0	0	0
C4	0	0	0	0
C5	0	0	0	0
C6	0	0	0	0
C7	3	1,1	0	0
C8	0	0	0	0
Th1	0	0	0	0
Th2	1	0,4	0	0
Th3	0	0	0	0
Th4	1	0,4	0	0
Th5	14	5	0	0
Th6	231	82,2	0	0
Th7	30	10,7	0	0
Th8	0	0	0	0
Th9	1	0,4	0	0
Th10	0	0	0	0
Th11	0	0	0	0
Th12	0	0	0	0
L1	0	0	0	0
Σ	281	100	0	0

Tab. 12: Segmentale Verteilung des Tracers in DRG-Neuronen. Die **fett** gedruckten Angaben entsprechen der Segmenthöhe der Tracerapplikationsstelle in den linken ICR.

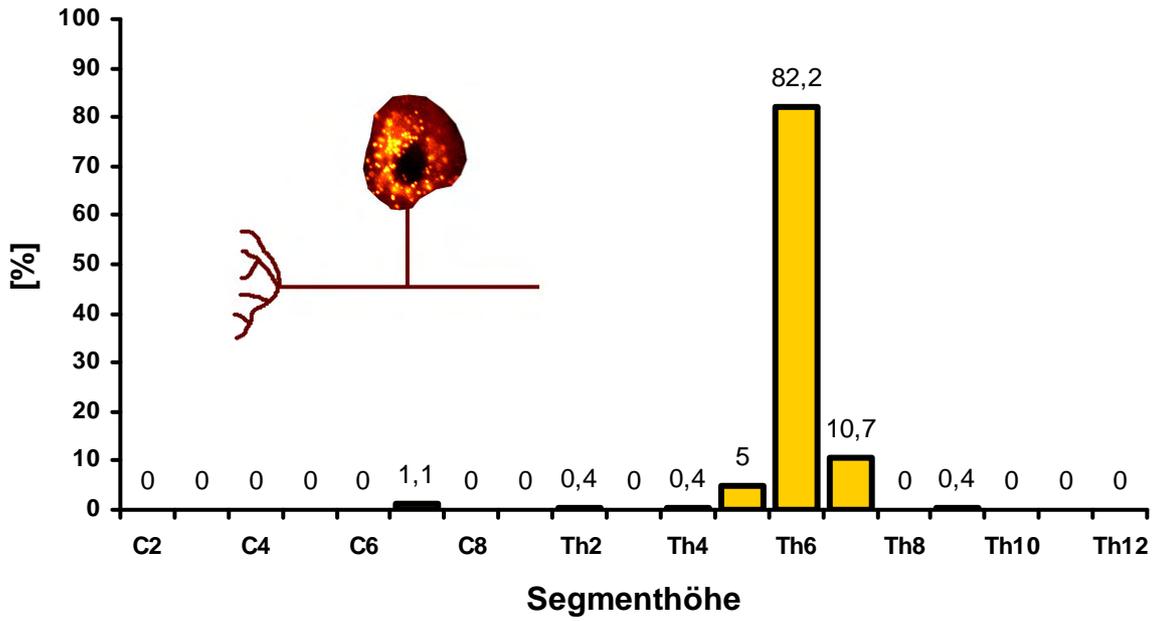


Abb. 27: Segmentale Verteilung des Tracers in DRG-Neuronen der ipsilateralen Seite.

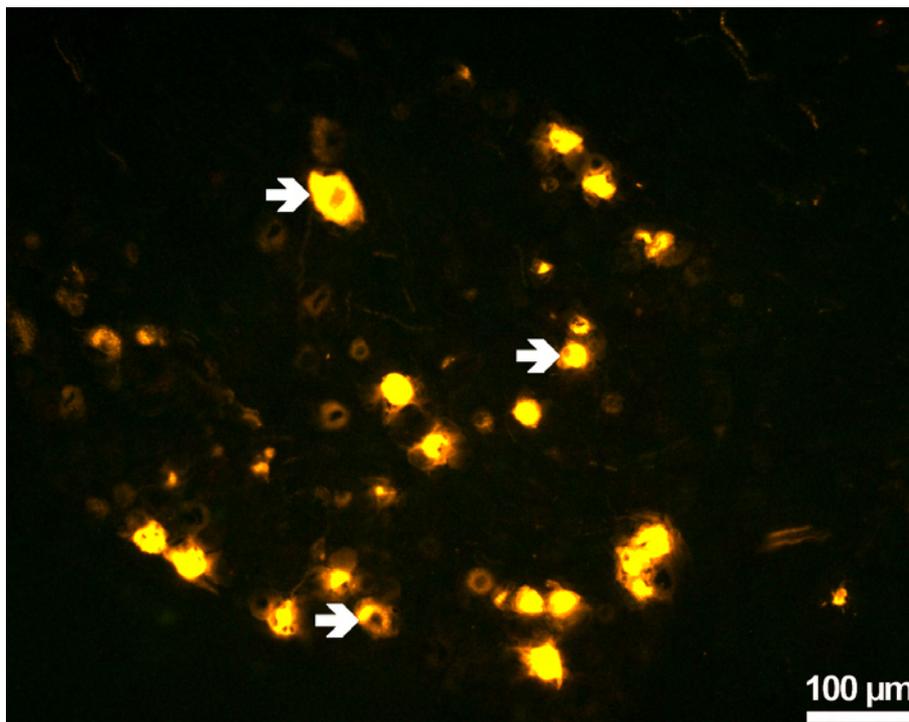


Abb. 28: Dil-positive DRG-Neurone (➔) in Höhe Th6, ipsilateral der Tracerapplikationsstelle.

3.3 Neurochemische Charakteristika Dil-positiver pleuraler DRG-Neuronen

3.3.1 Anteil von immunhistochemisch definierten Subpopulationen Dil-markierter DRG-Neurone

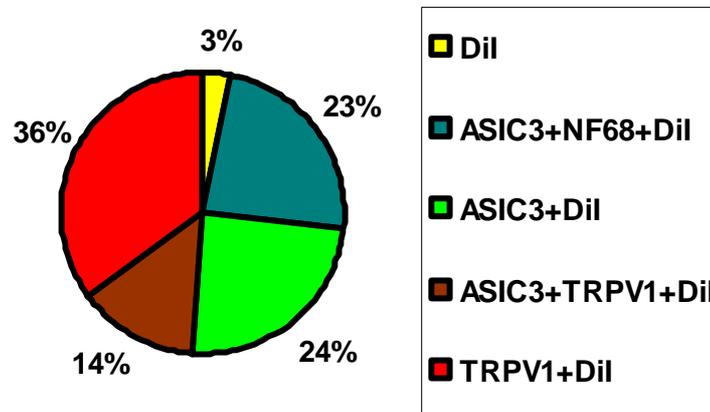


Abb. 29: Anteil von immunhistochemisch definierten Subpopulationen Dil-markierter DRG-Neurone (n=94 aus 5 Tieren).

Die mit Hilfe des Pleuratracings identifizierte Dil-positiven DRG-Neurone zwischen Th3 und Th6, ipsilateral der Tracerapplikationsstelle, wurden vermessen und auf Immunreaktivität bzgl. ASIC3, TRPV1 und NF68 untersucht (Abb. 29, Tab. 13 und Anhang, Tab. 19). Ohne Berücksichtigung des Neurondurchmessers konnten die in Abb. 29 dargestellten neurochemisch definierten Subpopulationen und ihr relativer Anteil definiert werden. 97 % der Neurone wiesen Immunreaktivität für ASIC3, TRPV1 oder beide Proteine auf. Lediglich 3 % der Neurone zeigten nur Immunreaktivität für Dil. In den folgenden Abschnitten werden diese Neurone als retrograd markierte Neurone ohne Immunreaktivität (\emptyset) bezeichnet. Die Abb. 30-34 zeigen Beispiele für die in Abb. 29 dargestellten Subpopulationen.

Unter Berücksichtigung des Durchmessers und mit Hilfe der Einteilung der Neurone in Gruppen $<35 \mu\text{m}$ und eine $>35 \mu\text{m}$ wurden 7 Neuronsubpopulationen definiert (Tab. 14).

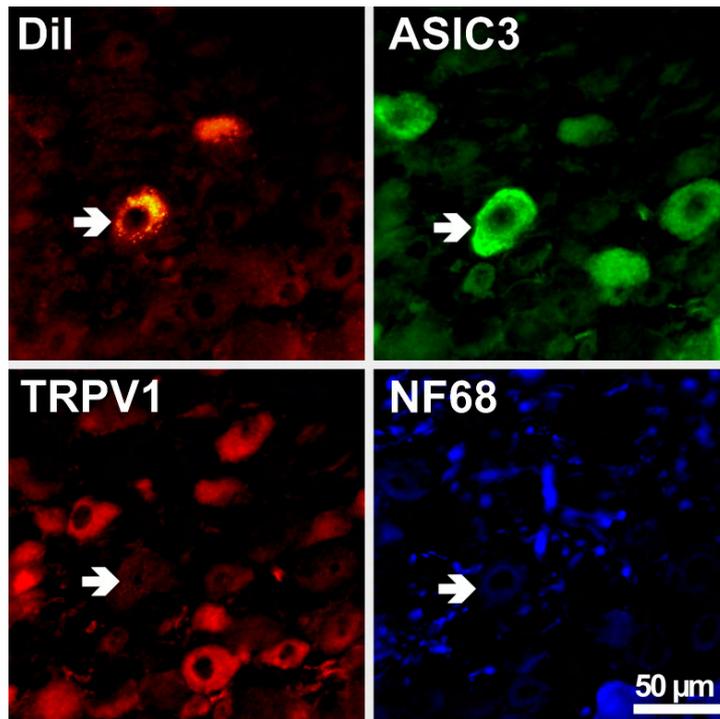


Abb. 30: Dargestellt ist ein Querschnitt durch ein DRG. Dreifachmarkierung eines retrograd markierten, Dil-positiven Neurons (→). Dieses Neuron weist Immunreaktivität für ASIC3 (→), nicht aber für TRPV1 (→) und NF68 (→) auf.

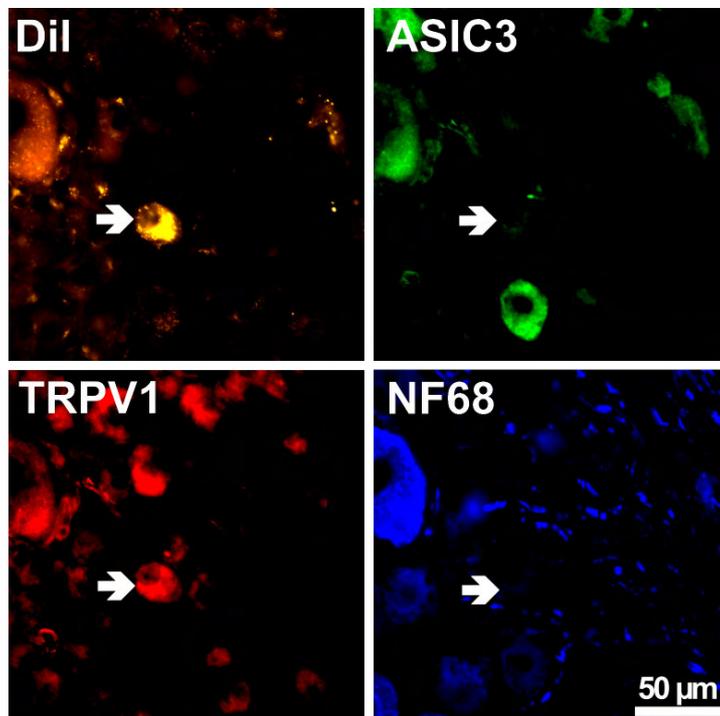


Abb. 31: Retrograd markiertes, Dil-positives Neuron im DRG-Querschnitt (→). Das Neuron ist TRPV1-positiv (→), jedoch ASIC3- (→) und NF68-negativ (→).

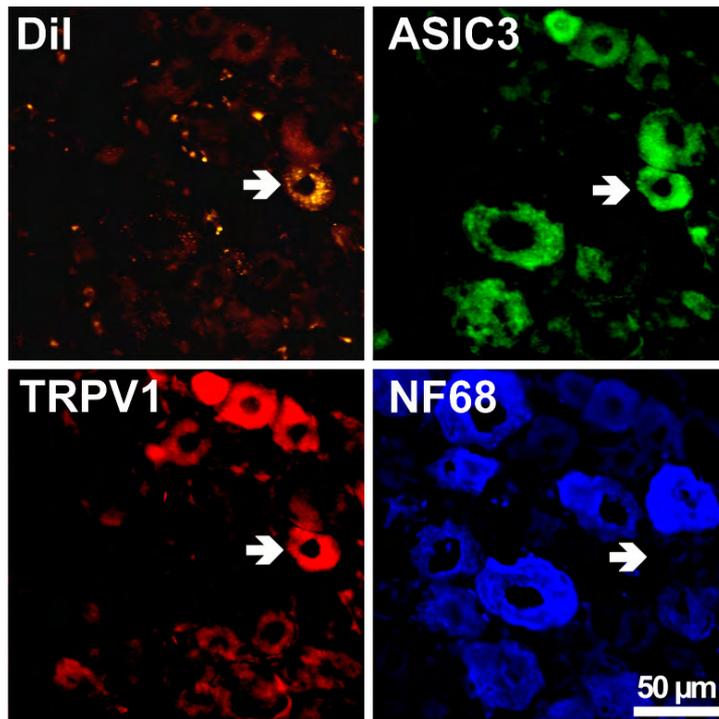


Abb. 32: Dargestellt ist ein Querschnitt durch ein DRG. Dreifachmarkierung eines retrograd markierten, Dil-positiven Neurons (➔). Dieses Neuron weist Immunreaktivität für ASIC3 (➔) und TRPV1 (➔), aber nicht für NF68 (➔) auf.

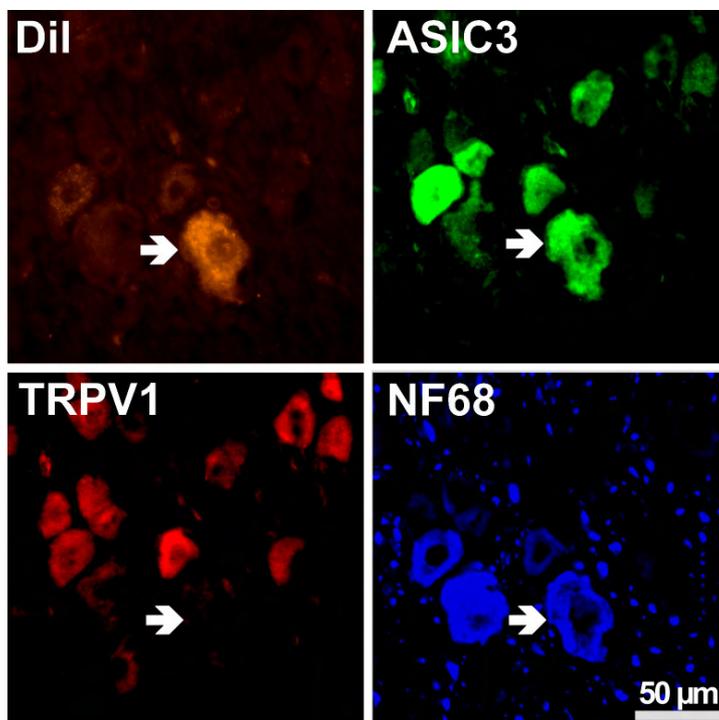


Abb. 33: Ein Dil-positives DRG-Neurone mit einem Durchmesser >35 μm (➔) weist Immunreaktivität für ASIC3 (➔) und NF68 (➔) auf, ist jedoch TRPV1-negativ (➔).

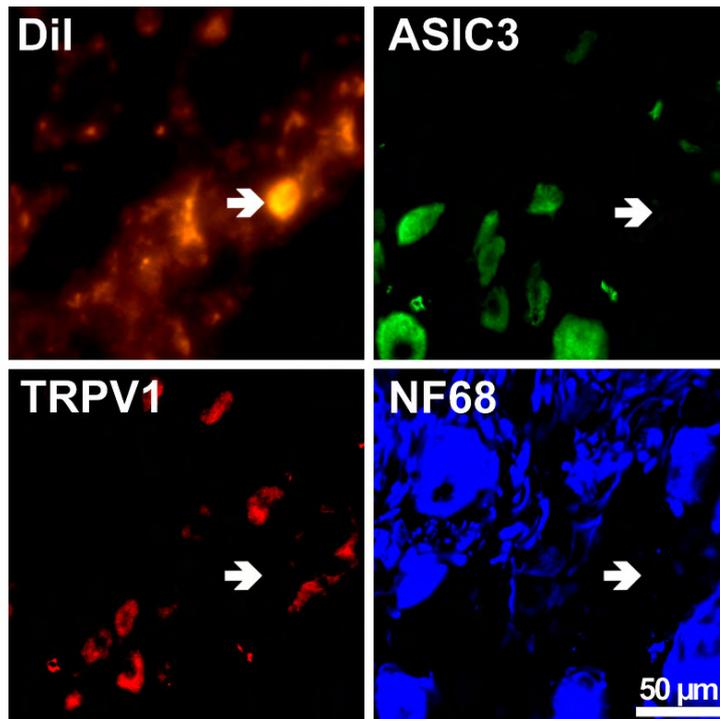


Abb. 34: Retrograd markiertes, Dil-positives Neuron im DRG-Querschnitt (➔). Das Neuron weist keine Immunreaktivität für ASIC3 (➔), TRPV1 (➔) und NF68 auf (➔).

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20	5	0	4		1	
20-25	43	10	20	0	8	3
25-30	27	7	8	0	2	9
30-35	12	5	1	0	2	4
35-40	4	1		0		3
40-45	3	0		0		3
gesamt	94	23	33	0	13	22

Tab. 13: Immunhistochemische Charakteristika Dil-positiver Neurone zwischen Th3 und Th6, links (n=94 aus 5 Tieren). Die Dil-Spalte gibt die Gesamtzahl retrograd markierter Neurone an, die anderen Spalten jeweils den Anteil an dieser Gesamtzahl.

Immunreaktivität	<35 µm	>35 µm
ASIC3	23,4 %	1,1 %
TRPV1	35,1 %	6,4 %
ASIC3/TRPV1	13,8 %	-
ASIC3/NF68	17 %	-
∅	3,2 %	-

Tab. 14: Subpopulationen Dil-positiver DRG-Neurone und ihre relative Häufigkeit. Die Größenangaben beziehen sich auf die Perikaryondurchmesser der Neurone. Die mit ∅ gekennzeichnete Subpopulation weist keine Immunreaktivität auf.

3.3.2 Perikaryondurchmesser von Dil-positiven und TRPV1-, ASIC3- sowie ASIC3/TRPV1-immunreaktiven Neuronen

TRPV1-Immunreaktivität war nur in Neuronen <35 µm zu finden (Abb. 35). Der größte Anteil TRPV1-markierter Neurone hatte einen Perikaryondurchmesser von 20-25 µm (21,28 %). ASIC3/TRPV1-immunreaktive Neurone zeigten ebenfalls eine Verteilungsspitze zwischen 20-25 µm (8,51 %) und waren auch stets <35 µm. Darüber hinaus zeigten sich Neurone <35 µm mit TRPV1- oder ASIC3/TRPV1-Immunreaktivität niemals gleichzeitig NF68-positiv (Tab. 14).

Von den Neuronen >35 µm besaßen 100 % Immunreaktivität für ASIC3 (Tab. 14, Abb. 35). Die Verteilungsspitze der ASIC3-positiven Neurone war zwischen 25-30 µm (17,02 %) lokalisiert. Neurone <20 µm wiesen keine alleinige ASIC3-Immunreaktivität auf.

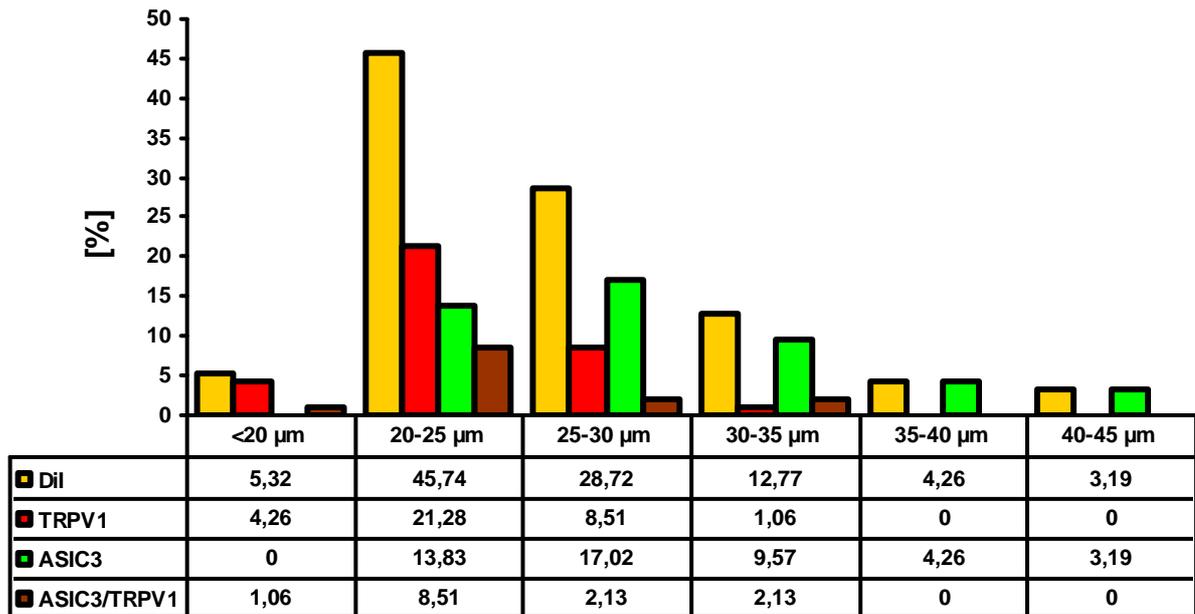


Abb. 35: Größenverteilung und Anteil von TRPV1-, ASIC3- und ASIC3/TRPV1-positiven Neuronen an Dil-positiven Neuronen. Die Zahlenwerte in den unteren vier Zeilen entsprechen den Prozentangaben der y-Achse.

3.3.3 Perikaryondurchmesser von Dil-positiven und ASIC3- bzw. ASIC3/NF68-immunreaktiven Neuronen

Betrachtet man Tab. 13, so fällt zunächst auf, dass alle NF68-positiven Neurone auch ASIC3-positiv waren. Der Anteil an NF68-immunreaktiven Neuronen und somit auch der Anteil ASIC3/NF68-positiver Neurone nahm mit steigendem Perikaryondurchmesser zu (Abb. 36).

Retrograd-markierte Neurone <20 μm zeigten keine Immunreaktivität für ASIC3/NF68. Fast alle Neurone >35 μm wiesen Immunreaktivität für ASIC3 in Kolokalisation mit NF68 auf (Tab. 13, Abb. 36). Lediglich ein Neuron in dieser Größenklasse war nur ASIC3-positiv.

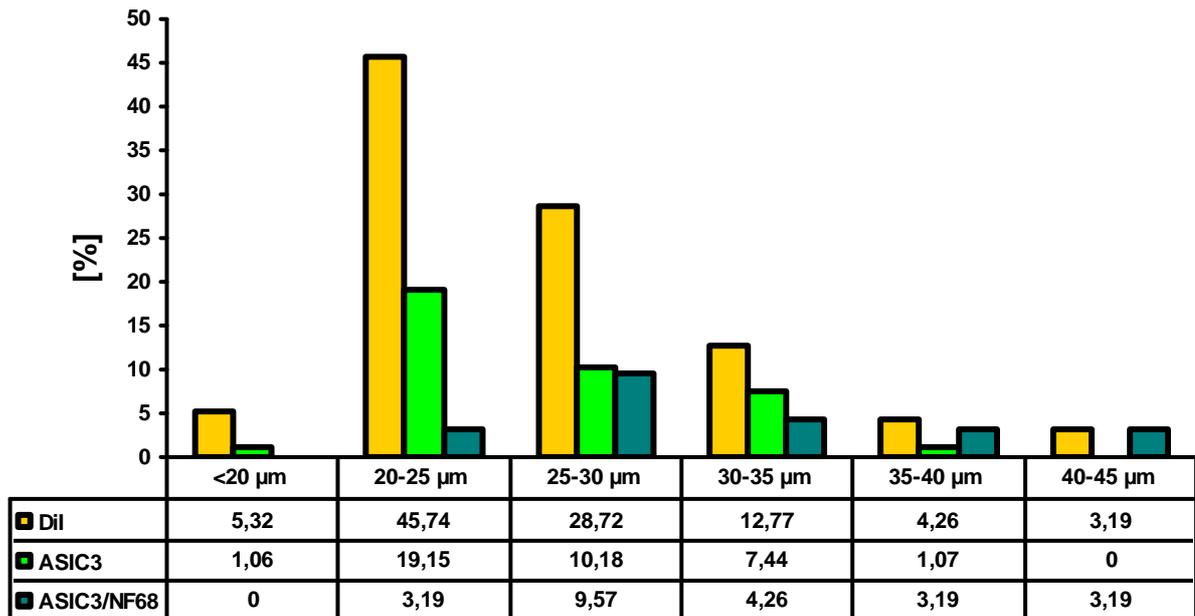


Abb. 36: Größenverteilung und Anteil von ASIC3- und ASIC3/NF68-positiven Neuronen an pleuralen Dil-markierten DRG-Neuronen. Die Zahlenwerte in den unteren drei Zeilen entsprechen den Prozentangaben der y-Achse.

3.3.4 Statistische Analyse auf Unterschiede zwischen den Neuronsubpopulationen <35 μm und >35 μm

Um festzustellen, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Subpopulationen Dil-markierter Neurone bzgl. ihrer Größe gibt, wurden alle Neurone in zwei Gruppen eingeteilt: Zum einen in kleine (<35 μm), zum anderen in große (>35 μm) Neurone. An diesem Datenmaterial wurde ein Chi²-Test durchgeführt, welcher einen signifikanten Unterschied ($p=0,0116$) zwischen den in Tab. 14 dargestellten Subpopulationen bestätigte. In einem weiteren Schritt wurden mit Hilfe von *Fisher's exaktem Test* die einzelnen Subpopulationen auf signifikante Unterschiede bzgl. ihrer Größe untereinander verglichen. Mit der Benferroni-Korrektur für multiples Testen wurde für diese Testung das Signifikanzniveau α von 0,05 auf 0,0071 korrigiert. Ein signifikanter Unterschied konnte lediglich zwischen den Subpopulationen ASIC3/NF68 und TRPV1 nachgewiesen werden (Tab. 15). Auf Grund teilweise zu geringer Neuronenzahlen konnten nicht alle Subpopulationen statistisch miteinander verglichen werden.

getestete Subpopulationen		p-Wert
ASIC3	ASIC3/NF68	0,0416
ASIC3	ASIC3/TRPV1	0,6389
ASIC3	TRPV1	0,4107
ASIC3	∅	0,8846
ASIC3/NF68	ASIC3/TRPV1	0,046
ASIC3/NF68	TRPV1	0,0026*
ASIC3/NF68	∅	0,4213

Tab. 15: Fisher`s exakter Test: $\alpha=0,0071$. Ein signifikanter Unterschied (*) zwischen Neuronenpopulationen $<35 \mu\text{m}$ und $>35 \mu\text{m}$ kann lediglich zwischen ASIC3/NF68 und TRPV1 nachgewiesen werden.

3.3.5 Statistische Analyse auf Unterschiede der Neuronsubpopulationen bzgl. NF68-Immunreaktivität

Zunächst wurde durch einen Chi²-Test gezeigt, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Subpopulationen ASIC3, ASIC3/TRPV1, TRPV1 und ∅ bzgl. der Immunreaktivität für NF68 besteht ($p<0,0001$). Die Testung auf Unterschiede zwischen diesen einzelnen Subpopulationen erfolgte durch *Fisher`s exakten Test*. Die Korrektur des Signifikanzniveaus auf Grund der multiplen Testung wurde mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur von 0,05 auf 0,0167 vorgenommen. Hierbei ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ASIC3 und ASIC3/TRPV1 ($p=0,0007$) sowie ASIC3 und TRPV1 ($p=0,0001$) ermitteln (Tab. 16). Auch bei dieser Testung konnten auf Grund teilweise zu niedriger Neuronzahlen nicht alle Subpopulationen miteinander verglichen werden.

getestete Subpopulationen		p-Wert
ASIC3	ASIC3/TRPV1	0,0007*
ASIC3	TRPV1	0,0001*
ASIC3	∅	0,1503

Tab. 16: Fisher`s exakter Test: $\alpha=0,0167$. Die Subpopulationen ASIC3 und ASIC3/TRPV1 bzw. ASIC3 und TRPV1 unterscheiden sich signifikant (*) bzgl. ihrer NF68-Immunreaktivität.

4 Diskussion

4.1 Retrograd-neuronales Tracing

4.1.1 Die Interkostalmuskulatur wird segmental durch DRG-Neurone innerviert

Bei einer Ratte wurde der Tracer Dil in einen ICM appliziert. Dieser Versuch diente als Kontrollversuch. Die der Tracerapplikationsstelle beim Pleuratracing direkt benachbarten Organe waren die Lunge und die Interkostalmuskulatur. Damit eine mögliche Markierung von Neuronen, welche diese beiden Organe innervieren, von pleuralen Afferenzen abgegrenzt werden konnte, waren genaue Kenntnisse über die Innervation dieser Organe notwendig. Im Gegensatz zur Lunge (Springall et al., 1987; Kummer et al., 1992; Helbig et al., 2005) existieren bisher noch keine Arbeiten, in denen Afferenzen der Pleura oder eines ICMs mittels retrograden Tracings markiert wurden.

Aus der Auswertung dieses Versuches konnte geschlossen werden, dass der 6. *M. intercostalis sinister* efferent durch ipsilaterale α -Motorneurone im Bereich der Segmenthöhen Th5-Th8 und afferent durch ipsilaterale DRG-Neurone der Segmenthöhen Th5-Th7 innerviert wird (s. 3.2). Bei der afferenten Innervation durch DRG-Neurone ist jedoch zu beachten, dass 82,2 % aller Dil-positiven Neurone auf Segmenthöhe Th6 zu finden waren (Tab. 12 u. Abb. 27). Diese Beobachtungen lassen auf eine segmentale efferente und afferente Innervation der Interkostalmuskulatur schließen, was im Einklang mit der allgemeinen Lehransicht steht (Putz, 1994).

4.1.2 Die Clearance des Tracers aus dem Pleuraspalt

Wie in 3.1.1 bereits erwähnt wurde, zeigte sich sowohl kurz nach der Tracerapplikation in den Pleuraspalt als auch sechs Tage später eine makroskopisch gut sichtbare Traceranreicherung auf der Pleura parietalis. Dieses deutet darauf hin, dass ein Großteil des Tracers zu diesem Zeitpunkt noch nicht durch Clearanceprozesse beseitigt worden war.

Die mikroskopische Beobachtung einer Entzündungsreaktion mit Dil-haltigen makrophagenähnlichen Strukturen (Abb. 10) in dem und um den Bereich der makroskopisch sichtbaren Traceranreicherung deutet auf eine entscheidende Rolle von phagozytotischen Zellen bei der Tracerbeseitigung hin. Diese Zellen erreichen

den Pleuraspalt vermutlich über Blutgefäße, welche die Pleura versorgen. Verlassen könnten diese Zellen zusammen mit nicht-phagozytierten Tracerresten die Pleurahöhle durch die Lymphstomata der parietalen Pleura. Dass das Lymphsystem der parietalen Pleura zu einem großen Teil für den Abtransport von Dil-haltigen Makrophagen sowie von Tracerresten verantwortlich sein könnte, wird durch folgende Beobachtungen unterstrichen: In der Interkostalmuskulatur konnten zahlreiche Dil-positive, gefäßähnliche Strukturen identifiziert werden. Durch Markierung dieser Strukturen mit einem RECA1-Antikörper, einem Marker für Gefäßendothelien (Duijvestijn et al., 1992), konnten einige dieser Strukturen als Blutgefäße identifiziert werden (Abb. 11). Die nicht mit dem RECA1-Antikörper markierten, gefäßähnlichen Strukturen könnten am ehesten als Lymphgefäße gedeutet werden. Dieses ist gut damit vereinbar, dass die Pleurahöhle hauptsächlich durch das Lymphsystem der Pleura parietalis drainiert wird. Ebenfalls gut zu dieser Interpretation passt auch die Beobachtung, dass nahezu keinerlei Dil-positive Strukturen im Lungenparenchym zu erkennen waren (Abb. 12-14). Dieses deutet auf eine geringe Bedeutung des Lymphgefäßsystems der viszeralen Pleura bei der Drainage der Pleurahöhle hin und steht im Einklang mit bisher veröffentlichten Untersuchungen (Wang, 1975; Albertine et al., 1984; Shinohara, 1997).

Die Tatsache, dass gefäßähnliche Strukturen und Tracerspuren auch in Anteilen der kontralateralen Interkostalmuskulatur, dem Thymus, dem Ösophagus, der vorderen Bauchwand, dem Zwerchfell und der Harnblase entdeckt wurden (s. 3.1.1 u. 3.1.2), wies jedoch auf eine zusätzliche systemische Verteilung des Tracers hin. Dieses steht im Einklang mit Untersuchungen von Werebe et al., die nach einer Talkum-Pleurodese bei Ratten eine systemische Verteilung des in den Pleuraspalt applizierten Talkums beobachten konnten (Werebe et al., 1999). Eine systemische Tracerverteilung könnte durch zwei Mechanismen erfolgt sein: Zum einen könnten Tracerreste durch das Lymphsystem der parietalen Pleura drainiert worden sein und anschließend via linkem Venenwinkel in den systemischen Kreislauf gelangt sein, zum anderen könnten subpleurale Gefäße Tracerreste aufgenommen haben. Die Beobachtung, dass unter pathophysiologischen Bedingungen die Drainagerate des Lymphgefäßsystems der parietalen Pleura um den Faktor 20-30 gesteigert werden kann (Shinohara, 1997), deutet auf eine systemische Tracerverteilung durch ersteren Mechanismus hin. Auf diese Art und Weise könnten auch Tracerspuren in Organe wie den Thymus oder Ösophagus gelangt sein.

Gegen eine systemische Verteilung des Tracers sprechen zunächst die Beobachtungen, dass das Lungenparenchym nur sehr wenige und das Myokard keinerlei Dil-positive makrophagenähnliche Strukturen aufwies (Abb. 12-16). Dieses könnte aber dadurch erklärt werden, dass diese beiden Organe eine hohe Ruhedurchblutung bezogen auf ihr Gewicht besitzen (Gaehtgens, 2001). Hierdurch könnten Tracerreste ausgespült worden sein. Ebenfalls zu einer Ausspülung von Tracerresten in diesen Geweben könnte die Perfusionsfixation geführt haben. Da der Perfusionskatheter in die Aorta thoracica vorgeschoben wurde, gehörten Gefäße wie die Koronarien sicherlich zu den am besten perfundierten.

Ein weiterer Mechanismus der zur Tracer clearance aus dem Pleuraspalt beiträgt, ist die Aufnahme von Tracer durch pleurale Mesothelzellen. Wie bereits in 1.2 erwähnt wurde, ist Dil ein lipophiler Tracer, der in die Lipiddoppelmembran von Zellen integriert wird und durch Endozytose ins Zytoplasma gelangen kann. Für eine Aufnahme des Tracers durch diesen Mechanismus spricht die Dil-Markierung sowohl der ipsilateralen parietalen als auch viszeralen Pleura (Abb. 12). Hierbei war auffällig, dass die stärkste Fluoreszenz der Pleura visceralis in den dorsokostalen Anteilen zu beobachten war. Diese Anteile waren der Tracerapplikationsstelle am nächsten und wiesen daher die höchste Tracerkonzentration auf. Der Pleuramesothelzelle scheint also eine Bedeutung bei der Pleuraclearance zuzukommen, was die von Antony erwähnte phagozytotische Funktion dieses Zelltyps unterstreicht (Antony, 2003).

Da auch Anteile der Epikards und der kontralateralen Pleura visceralis Tracerspuren aufwiesen (Abb. 14 u. 16), kann davon ausgegangen werden, dass der Tracer durch Interzellularporen (s. 1.1.1) in die Perikardhöhle und von hier aus in die kontralaterale Pleurahöhle gelangt ist. Somit erfolgte vermutlich ein Teil der Tracer clearance über das Lymphdrainagesystem der Perikardhöhle sowie der kontralateralen Pleurahöhle. Neben der Erklärung einer systemischen Tracerverteilung können Tracerspuren in der Muscularis sowie der Submukosa des Ösophagus und der kontralateralen Interkostalmuskulatur so auch durch eine Lymphdrainage aus der Perikard- und kontralateralen Pleurahöhle erklärt werden. An menschlichen Leichnamen konnte demonstriert werden, dass die Lymphdrainage aus der Perikardhöhle u.a. in juxtaösophageale Lymphknoten erfolgt (Eliskova et al., 1995).

4.1.3 Dil-markierte DRG-Neurone entsenden pleurale Afferenzen

Neben der Integration des lipophilen Tracers Dil in die Lipiddoppelmembranen von Makrophagen und Mesothelzellen wurde der fluoreszierende Markierungsstoff auch von Nerven terminalen aufgenommen (Abb. 3). Von hier wurde der Tracer retrograd in die jeweiligen Perikarya transportiert. Serienschnitte an DRG-Neuronen der Segmenthöhen C2-L1, den Ganglia jugulare et nodosum sowie der Rückenmarkssegmente in Höhe C3-Th7 zeigten beim Pleuratracing retrograd markierte Neurone in sensiblen DRG-Neuronen und den Ganglia jugulare et nodosum. In den Rückenmarksegmenten C3-Th7 waren keine α -Motorneurone markiert. Hiermit konnte ausgeschlossen werden, dass die Nervenversorgung benachbarter Organe, wie die Interkostalmuskulatur oder das Zwerchfell markiert wurden. Die Interkostalmuskulatur wird segmental durch α -Motorneurone innerviert, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (s. 4.1.1). Das Zwerchfell wird durch α -Motorneurone der Segmenthöhen C3-C5 innerviert, die im N. phrenicus verlaufen (Goshgarian et Rafols, 1981). Der N. phrenicus accessorius kann darüber hinaus bei der Ratte ebenfalls das Zwerchfell motorisch versorgende Efferenzen entsenden, deren Perikarya im Vorderhorn des Rückenmarks bis in Segmenthöhe Th6 lokalisiert sind (DeVries et Goshgarian, 1989).

Die Betrachtung der segmentalen Verteilung der retrograd markierten DRG-Neurone ließ sowohl ipsi- als auch kontralateral zwei Verteilungsspitzen erkennen (Tab. 9 u. 10): Zum einen zwischen den Segmenten C4 und C6, zum anderen zwischen Th1 und Th7. Die Afferenzen des N. phrenicus sind bei der Ratte in DRG-Neuronen der Segmenthöhen C2-C6 lokalisiert (Song et al., 1999). Ihre Aufgabe liegt u.a. in der sensiblen Versorgung von Pleura und Perikard (Duncker, 1994; Fleischhauer, 1994). Da das Epikard nachweislich mit dem Tracer markiert wurde, und somit eine Perikardmarkierung sehr wahrscheinlich war, konnten DRG-Neurone der Segmente C4 und C6 nicht eindeutig als pleurale Afferenzen identifiziert werden.

Die Markierung von DRG-Neuronen der Segmente in Höhe Th1-Th7 passt sehr gut zu der in der Literatur beschriebenen segmentalen Innervation der Pleura durch Interkostalnerven (Duncker, 1994; Jammes et al., 2005). Eine Dil-Markierung des ICMs, welcher sensibel ebenfalls segmental innerviert wird (4.1.1), konnte durch die fehlende Markierung von α -Motoneuronen in den Segmenthöhen Th1-Th7 ausgeschlossen werden. Mehrere Arbeiten belegen jedoch, dass die Lunge neben Afferenzen aus den Ganglia jugulare et nodosum auch durch DRG-Neurone sensibel

innerviert wird (Springall et al., 1987; Kummer et al., 1992; Helbig et al., 2005; Groth et al. 2006). Diese Innervation erfolgt hauptsächlich durch DRG-Neurone der Segmenthöhen Th1-Th2 (Springall et al., 1987; Helbig et al., 2005; Groth et al. 2006). Außerdem wird das Perikard größtenteils durch DRG-Neurone der Segmenthöhen bis Th3 innerviert (Alles et Dom, 1985; McNeill et Burden, 1986; Quigg, 1988). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit einer Beobachtung dieser Arbeit: In Abb. 22 ist die relative Anzahl Dil-positiver Neurone in dem DRG, welches der Höhe des ICRs der Tracerapplikationsstelle entsprach, und jeweils zwei kranial und kaudal davon gelegenen DRGs dargestellt. War bei den zwei kaudal gelegenen DRGs eine Abnahme der Dil-markierten Neurone zu erkennen, so sank der Anteil kranialwärts zunächst von 24,63 % auf 4,74 %, um dann wieder auf 8,61 % anzusteigen. Da die Tracerapplikationsstelle sich stets zwischen dem 3. und 6. ICR befand, und die Pleura parietalis hier vermutlich durch DRG-Neurone der Segmenthöhen Th3-Th6 innerviert wird, könnte dieser Anstieg am besten durch eine Markierung pulmonaler bzw. kardialer Afferenzen erklärt werden. Einen weiteren Hinweis darauf, dass beim Pleuratracing auch einzelne pulmonale Afferenzen markiert wurden, gab v.a. die Ratte 5. Bei diesem Tier gelangte während der Tracerapplikation eine größere Tracermenge auf die Lungenoberfläche. Dieses machte sich dadurch bemerkbar, dass während der Präparation, sechs Tage nach Tracerapplikation, eine makroskopisch sichtbare Traceranreicherung auf der Lungenoberfläche zu erkennen war. Bei den anderen Tieren konnte eine solche Traceranreicherung makroskopisch stets nur auf der Pleura parietalis lokalisiert werden. Entsprechend wies dieses Tier den größten relativen Anteil Dil-markierter Neurone in den Ganglia jugulare et nodosum auf. Dies spricht für eine zusätzliche Markierung einiger pulmonaler Afferenzen, da die Lunge zu einem Teil durch vagale Afferenzen innerviert wird (Springall et al., 1987). Wie bereits erwähnt, wird die Lunge darüber hinaus größtenteils durch DRG-Neurone der Segmenthöhen Th1-Th2 innerviert. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit nur DRG-Neurone der Segmenthöhen Th3-Th12 eindeutig als pleurale Afferenzen identifiziert und zu einer weiteren morphologisch-neurochemischen Charakterisierung herangezogen. Unterhalb der Segmenthöhe Th12 konnten keine retragrad-markierten DRG-Neurone aufgefunden werden. Dieses spricht wiederum für eine segmentale Innervation der Pleura parietalis durch Interkostalnerven.

Die Ergebnisse könnten des Weiteren einen Hinweis darauf geben, dass die Innervation der Pleura sowohl durch ipsilaterale als auch durch kontralaterale DRG-Neurone erfolgt (s. 3.1.3). So lag das Verhältnis ipsi- zu kontralateral markierter DRG-Neurone zwischen 1:1 und 4:1. Hierbei muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass das Verhältnis ipsi- zu kontralateral von 1:1 bei der Ratte 4 durch nicht auswertbare DRGs auf der ipsilateralen Seite verursacht wurde. Der Grund für diese beidseitige Innervation der Pleura könnte in der sehr weit dorsal gelegenen Tracerapplikationsstelle liegen: Gerade in den dorsal gelegenen Pleuraabschnitten könnten sich die Innervationsgebiete des ipsi- und kontralateralen Interkostalnerven überschneiden. Je weiter frontal ein Pleuraabschnitt gelegen ist, desto eher wird er nur vom ipsilateralen Interkostalnerven innerviert, bis das Innervationsgebiet des Interkostalnerven schließlich in das des N. phrenicus mündet. Außerdem wurde bereits von einer Markierung dorsal gelegener Anteile der kontralateralen Pleura visceralis berichtet. Es kann auf Grund dieser Beobachtung davon ausgegangen werden, dass auch Teile der kontralateralen Pleura parietalis Dil-Markierung aufwiesen. Dieses kann ein weiterer Grund für die beidseitige Markierung von DRG-Neuronen sein.

Die bisher gemachten Aussagen beziehen sich hauptsächlich auf die Innervation der Pleura parietalis. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass bei den vorliegenden Untersuchungen auch Nerven der viszeralen Pleura retrograd markiert wurden. Diese kann ebenfalls zu einer Markierung von DRG-Neuronen oder Neuronen der Ganglia jugulare et nodosum geführt haben.

4.2 Pleurale Afferenzen besitzen verschiedene Charakteristika

4.2.1 Einteilung in $A\alpha/\beta > A\delta$ -, $A\delta > A\alpha/\beta$ - und C-Fasern

Ipsilaterale DRG-Neurone der Segmenthöhen Th3-Th6 konnten mittels retrograden Tracings als pleurale Afferenzen identifiziert werden. Um sie genauer bzgl. ihrer Leitungsgeschwindigkeit (und ihres Myelinisierungsgrades) zu charakterisieren, wurde der Durchmesser ihrer Perikarya bestimmt, und sie wurden auf Immunreaktivität bzgl. NF68 untersucht. Sowohl der Perikaryondurchmesser als auch der NF68-Gehalt von DRG-Neuronen geben Aufschluss über deren Leitungsgeschwindigkeit bzw. den Myelinisierungsgrad (Lawson et Waddell, 1991). Zur Einteilung der Neurone in drei verschiedenen Neuronpopulationen, welche $A\alpha/\beta > A\delta$ -, $A\delta > A\alpha/\beta$ - und C-Fasern entsenden, diente Tab. 17, welche in Anlehnung an Tab. 1 (1.3) entstanden ist. Eine Unterscheidung zwischen $A\alpha/\beta$ - und $A\delta$ -Fasern war auf Grund der sich überschneidenden Perikaryondurchmesser nicht möglich (s. Tab 1 in 1.3). Es konnte lediglich angenommen werden, dass ab einem bestimmten Perikaryondurchmesser der Anteil an $A\alpha/\beta$ - größer als der Anteil der $A\delta$ -Fasern war. Aus diesem Grund wurden für myelinisierte Neurone die Gruppen $A\alpha/\beta > A\delta$ (Neurone $>35 \mu\text{m}$) und $A\delta > A\alpha/\beta$ (myelinisierte Neurone $<35 \mu\text{m}$) festgelegt. Da die Angaben zu den Perikaryondurchmessern in Tab. 1 auf in Paraffinwachs eingebetteten Geweben beruhen, in dieser Arbeit aber Gefrierschnitte Verwendung fanden, wurden die Angaben etwas nach oben korrigiert. So dienten die Perikaryondurchmesser der Neurone zur Einteilung in $A\alpha/\beta > A\delta$ - oder $A\delta > A\alpha/\beta$ und C-Fasern. Alle Neurone $>35 \mu\text{m}$ wurden der ersten Kategorie zugeordnet. Bei dieser Einteilung muss jedoch beachtet werden, dass die Übergänge zwischen $A\alpha/\beta > A\delta$ - oder $A\delta > A\alpha/\beta$ - und C-Fasern fließend verlaufen und dadurch beispielsweise einige $A\alpha/\beta > A\delta$ - als $A\delta > A\alpha/\beta$ - und C-Fasern klassifiziert worden sein können und umgekehrt. Zellen $<35 \mu\text{m}$ wurden auf Grund ihrer NF68-Immunreaktivität in $A\delta > A\alpha/\beta$ - oder C-Fasern unterteilt. C-Fasern sind unmyelinisiert und daher NF68-negativ. Die NF68-positiv bzw. negativ-Bewertung, besonders von Neuronen, welche nur sehr geringe Immunreaktivität für NF68 aufwiesen, fiel teilweise sehr schwierig aus. Deshalb können auch einige $A\delta > A\alpha/\beta$ - als C-Fasern klassifiziert worden sein und umgekehrt. Betrachtet man Tab. 18, so fällt auf, dass der größte Anteil der pleuralen Afferenzen Neurone mit C-Faser-Qualität besitzt (76,3 %). Die Häufigkeit von $A\alpha/\beta > A\delta$ -Fasern ist mit 6,5 % am geringsten. $A\delta > A\alpha/\beta$ -Fasern weisen einen Anteil von 17,2 % auf. Dieses Ergebnis deckt sich größtenteils mit den elektrophysiologischen

Untersuchungen von Wedekind (1997) und Jammes et al. (2005) an Kaninchen, die pleurale Afferenzen als Nervenfasern der Gruppen III und IV nach Lloyd und Hunt identifiziert haben, welche A δ - und C-Fasern nach Erlanger und Gasser entsprechen (s. 1.3).

Da C- und A δ >A α / β -Fasern zwar nicht ausschließlich, aber zum größten Teil Nozizeptoren sind (Snider et McMahon, 1998; Lawson, 2002), sprechen diese Beobachtungen für eine hohe Schmerzempfindlichkeit der Pleura parietalis (Ingram, 1987). Weil bei der Ratte darüber hinaus 20 % aller somatischen Afferenzen mit A α / β -Qualität nozizeptive Funktionen übernehmen sollen (Djoughri et Lawson, 2004), könnten auch die A α / β >A δ -Fasern zu dieser Schmerzempfindlichkeit beitragen.

Faserqualität	Perikaryondurchmesser (in μ m)	Neurofilament (NF)	Anzahl	%
A α / β >A δ	>35	positiv	6	6,5
A δ >A α / β	<35	positiv	16	17,2
C	<35	negativ	71	76,3
			93	100

Tab. 17: Einteilung von pleuralen Afferenzen bzgl. ihres Perikaryondurchmessers und ihrer NF68-Immunreaktivität (n= 93 aus 5 Tieren). Die Angaben wurden Tab. 13 entnommen. Die Neurongesamtzahl beträgt im Gegensatz zu Tab. 13 nur 93, da ein Neuron auf Grund seiner Merkmale (NF negativ und >35 μ m) nicht in das Schema passte.

4.2.2 Pleurale Afferenzen können in ASIC3-, TRPV1- und ASIC3/TRPV1-positive Neuronsubpopulationen unterteilt werden

Neben der Ermittlung des Perikaryondurchmessers und NF-68-Gehalts der pleuralen Afferenzen wurden die so charakterisierten Neurone auf ihre Immunreaktivität bzgl. zweier pH-sensitiver Ionenkanäle, ASIC3 und TRPV1, untersucht. Erniedrigungen des pH-Wertes können unter inflammatorischen Bedingungen beobachtet werden (Jacobus et al., 1977) und Schmerzen verursachen (Jones et al., 2004). Es konnte

nachgewiesen werden, dass ein großer Anteil der pleuralen Afferenzen (97 %) Immunreaktivität gegen zumindest einen dieser Kanäle aufweist.

Dadurch, dass diese beiden Ionenkanäle entweder allein oder in Kolokalisation in einzelnen DRG-Neuronen vorkamen, konnten die bisher aufgestellten Neuronpopulationen in Subpopulationen unterteilt werden. Durch einen Chi²-Test konnte ein signifikanter Unterschied der einzelnen Subpopulationen bzgl. der Merkmale Perikaryongröße (<35 µm oder >35 µm) sowie NF68-Immunreaktivität (NF68-positiv oder NF68-negativ) nachgewiesen werden (s. 3.3.4 u. 3.3.5). Ein Vergleich der im Chi²-Test getesteten Subpopulationen untereinander mit Hilfe von Fisher's exaktem Test zeigte jedoch nur zwischen folgenden Subpopulationen einen signifikanten Unterschied (Tab. 16 u. 17): Bzgl. der Merkmale <35 µm bzw. >35 µm konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Subpopulationen ASIC3/NF68 und TRPV1 gezeigt werden. Erstgenannte Subpopulation war charakteristisch für große, myelinisierte A-Fasern, letztgenannte für kleine, unmyelinisierte C-Fasern. Die Subpopulationen ASIC3 und ASIC3/TRPV1 sowie ASIC3 und TRPV1 wiesen bzgl. der Merkmale NF68-positiv bzw. NF68-negativ einen signifikanten Unterschied auf. So waren Neurone, welche ausschließlich ASIC3-positiv waren, häufig myelinisiert (NF68-positiv), wohingegen alle Neurone, welche TRPV1-Immunreaktivität aufwiesen, unmyelinisiert (NF68-negativ) waren. Die einzelnen Subpopulationen sind in Tab. 18 dargestellt.

	Faserqualität	Subpopulation	Anzahl	%
	Aα/β>Aδ	ASIC3	6	6,5
	Aδ>Aα/β	ASIC3	16	17,2
	C	ASIC3	22	23,7
		TRPV1	33	35,5
ASIC3/TRPV1		13	14	
∅		3	3,2	
			93	100

Tab. 18: Einteilung pleuraler Afferenzen in Subpopulationen. Die Angaben wurden Tab. 13 entnommen. Die Neurongesamtzahl beträgt im Gegensatz zu Tab. 13 nur 93 (s. Tab. 17).

4.2.3 Mögliche Funktionen verschiedener Neuronsubpopulationen pleuraler Afferenzen

A α / β >A δ -Fasern

In der Neuronpopulation, welche A α / β >A δ -Fasern entsenden, wurden sechs Neurone untersucht. Diese Neurone wiesen ausschließlich ASIC3-Immunreaktivität auf. Ihre Aufgabe könnte in der Mechanotransduktion oder Nozizeption liegen.

Folgende Gründe sprechen für eine mechanotransduktive Funktion dieser Neurone: In Kapitel 1.4.1.3 wurde bereits erwähnt, dass Stomatin, ein integrales Membranprotein, ASIC3 dadurch, dass es diesen mit zytoplasmatischen Elementen verbindet, zum Mechanotransduktor machen und in seiner nozizeptiven Funktion, insbesondere bzgl. pH-Wert-Änderungen, einschränken könnte (Price et al., 2004). Da alle A α / β -Fasern myelinisiert und somit reich an NF waren, könnte man die Hypothese aufstellen, dass NF zu den zytoplasmatischen Elementen gehört, welche durch Stomatin mit ASIC3 verbunden werden. Dieses müsste jedoch noch nachgewiesen werden. Ein weiterer Grund, welcher für eine Rolle ASIC3-positiver A α / β -Fasern bei der Mechanotransduktion spricht, ist die vornehmliche Verteilung von Mechanorezeptoren in der A α / β -Gruppe (Lawson, 2002). Ob diese Fasern nozizeptiv- oder nicht-nozizeptiv-mechanotransduktive Funktionen ausüben, bleibt noch zu eruieren. Als nozizeptive Mechanorezeptoren könnten sie beispielsweise an der Generation von Pleuraschmerzen bei einer Pleuritis sicca beteiligt sein, welche durch das Aneinanderreiben der beiden Pleurablätter entstehen.

Gründe, welche für eine Beteiligung ASIC3-positiver Neurone an der Nozizeption sprechen, sind die Eigenschaften von ASIC3, durch inflammatorische Metaboliten und Mediatoren sowie Gewebsazidose aktiviert bzw. moduliert werden zu können (s. 1.4.1.3). So kann die Aktivierungsschwelle von ASIC3 durch eine Steigerung der Laktatkonzentration herabgesetzt werden (Immke et McClesky, 2001). Eine solche Konzentrationserhöhung ist insbesondere bei inflammatorischen Prozessen wie bei einer Pleuritis zu beobachten (Tasci et al., 2004). Darüber hinaus induzieren inflammatorische Mediatoren wie NGF, Serotonin, Bradykinin und IL-1 die Bildung von ASIC3-spezifischer mRNA (Mamet et al., 2002). Nicht zuletzt gelten Wasserstoffionen, deren Konzentration unter inflammatorischen Bedingungen ebenfalls erhöht sein kann, als klassischer Ligand des ASIC3 (Sutherland et al., 2001).

Somit könnten ASIC3-positive Neurone mit schnell leitender A α / β -Faserqualität für den somatischen, stechenden und gut lokalisierbaren Pleuraschmerz verantwortlich sein und evtl. als mechano- und pH-sensitive Nozizeptoren fungieren.

Welche Aufgaben den retrograd markierten DRG-Neuronen der dargestellten Subpopulation nun genau zukommt, muss noch detaillierter untersucht werden. Mit einem Anteil von 6,5 % an den pleuralen Afferenzen machen sie jedoch eher einen geringeren Anteil aus, was jedoch nicht mit einer untergeordneten Bedeutung korreliert. Außerdem könnten sich die ASIC3-positiven Neurone untereinander durch andere Eigenschaften wie z.B. den Gehalt an Neuropeptiden oder der Expression weiterer Ionenkanäle oder Rezeptoren unterscheiden.

A δ >A α / β -Fasern

Unter den A δ -Fasern konnte eine Subpopulation ASIC3-positiver Neurone identifiziert werden. Für die möglichen Aufgaben dieser Neurone gilt Ähnliches wie für die im vorherigen Abschnitt beschriebene Subpopulation. Ihnen könnten also Aufgaben in der nicht-nozizeptiven Mechanorezeption sowie der Nozizeption zukommen. Auffällig erscheint nur, dass alle myelinisierten, pleuralen Afferenzen (A α / β - und A δ -Fasern) ASIC3 exprimieren.

C-Fasern

Die Population der retrograd markierten DRG-Neurone mit C-Faserqualität ließ sich in vier Subpopulationen unterteilen (Tab. 18).

Eine Subpopulation, welche mit 23,7 % den zweitgrößten Anteil an allen Subpopulationen ausmachte, wies ebenfalls nur Immunreaktivität für den Ionenkanal ASIC3 auf. Diesmal sei jedoch darauf hingewiesen, dass ASIC3 hier in unmyelinisierten Neuronen mit C-Faserqualität vorkam. Die Aufgabe dieser Subpopulation könnte wiederum in der Mechanotransduktion oder Nozizeption liegen, denn auch Neurone mit C-Faserqualität können als nozizeptive Mechanorezeptoren fungieren (Lawson, 2002).

Nur in pleuralen C-Faser-Afferenzen anzutreffen war der TRPV1. Dies entspricht der generellen Annahme, dass Neurone mit C-Faserqualität zwar nicht ausschließlich, aber zum größten Teil nozizeptive Funktionen übernehmen (Lawson, 2002). Der TRPV1 wird darüber hinaus als klassischer Marker nozizeptiver Neurone beschrieben (Tominaga et Julius, 2000).

Zwei verschiedene C-Faser-Subpopulationen wiesen TRPV1-Immunreaktivität auf: Zum einen Neurone, welche nur TRPV1-positiv waren, zum anderen Neurone, welche sich ASIC3/TRPV1-positiv zeigten. Die Subpopulation, welche nur TRPV1-Immunreaktivität aufwies, war mit 35,5 % die größte aller Subpopulationen. Der TRPV1 kann als polymodaler Nozizeptor betrachtet werden, der durch Noxen wie Hitze, Protonen, Vanilloide, aber auch inflammatorische Mediatoren moduliert oder aktiviert werden kann (s. 1.4.2.5). Somit scheint dieser Subpopulation eine entscheidende Rolle bei der Wahrnehmung pleuraler Schmerzen zuzukommen. Pleurale Afferenzen mit C-Faserqualität, die Immunreaktivität für den TRPV1 in Kolokalisation mit ASIC3 aufwiesen, nahmen einen Anteil von 14 % ein. Diese Subpopulation erfüllt mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Grund ihrer TRPV1-Expression nozizeptive Funktionen.

Drei Neurone mit C-Faserqualität zeigten keine Immunreaktivität für die beiden Ionenkanäle. Diese Subpopulation war mit einem Anteil von 3,2 % die kleinste.

Abschließend kann festgehalten werden, dass C-Fasern mit insgesamt 76,3 % den größten Anteil an pleuralen Afferenzen einnehmen. Auf Grund des hohen Anteils an TRPV1-immunreaktiven Neuronen übernehmen diese Fasern höchstwahrscheinlich überwiegend nozizeptive Funktionen. Die meisten dieser Fasern könnten als polymodale Nozizeptoren für eine viszerale, dumpfe und schlecht lokalisierbare Schmerzqualität verantwortlich sein. Pleurale A-Fasern mit einem Anteil von 13,7 % (6,5 % $A\alpha/\beta > A\delta$ - und 17,2 % $A\delta > A\alpha/\beta$ -Fasern) könnten eine somatische, stechende und gut lokalisierbare Schmerzwahrnehmung vermitteln.

4.2.4 Vergleich der erhobenen Ergebnisse mit bisherigen Veröffentlichungen

Die Veröffentlichungen von Wedekind (1997) und Jammes et al. (2005) haben sich mit den elektrophysiologischen Eigenschaften von pleuralen Afferenzen des Kaninchens beschäftigt. Beide kamen zu dem Ergebnis, dass die Pleura parietalis durch Nervenfasern der Gruppe III-IV (entsprechend $A\delta$ - und C-Fasern nach Erlanger und Gasser) versorgt wird. Ein ähnliches Ergebnis konnte in dieser Arbeit erhoben werden: Nahezu alle pleuralen Afferenzen konnten den $A\delta$ - und C-Fasern zugeordnet werden. Lediglich 6,5 % leiteten in der $A\alpha/\beta > A\delta$ -Fasergruppe.

Jammes et al., welche sich im Gegensatz zu Wedekind mit den pleuralen Afferenzen der Interkostalnerven beschäftigten, konnten feststellen, dass 97 % aller untersuchten pleuralen Nervenfasern mechanotransduktive Eigenschaften besitzen.

Dieser Anteil entspricht genau dem Anteil von pleuralen Afferenzen, welche in der vorliegenden Arbeit pH-sensitive Ionenkanäle exprimieren (Abb. 29). Des Weiteren reagierten 57 % der von Jammes et al. getesteten Afferenzen mit einer Aktivitätsänderung auf eine Capsaicin-Applikation. Der Anteil TRPV1-exprimierender Afferenzen war in der vorliegenden Arbeit ähnlich hoch und lag bei 50 % (Abb. 29). Da Capsaicin ein Ligand des TRPV1 ist (s. 1.4.2), ergänzen sich diese Beobachtungen.

Neben pleuralen Afferenzen wurden in weiteren Arbeiten auch Afferenzen der Lunge, des Muskels und der Haut durch retrograd-neuronales Tracing markiert und auf Immunreaktivität bzgl. ASIC3 untersucht. So waren 54 % der pulmonalen Afferenzen ASIC3-immunreaktiv (Groth et al., 2006), wohingegen 61 % der pleuralen Afferenzen Immunreaktivität für ASIC3 zeigten (Abb. 29). Molliver et al. (2005) verglichen das Vorkommen von ASIC3 in Afferenzen des Muskels und der Haut mit einem Perikaryondurchmesser $<25 \mu\text{m}$. 50 % der Muskel- und 28 % der kutanen Afferenzen besaßen Immunreaktivität für ASIC3. Diese Afferenzen entsprechen auf Grund ihres kleinen Perikaryondurchmessers am ehesten C-Fasern. In der Gruppe der C-Fasern pleuraler Afferenzen nehmen die ASIC3-positiven Neurone einen Anteil von 49 % ein (Tab. 18). Diese Beobachtungen zeigen, dass bestimmte Organsysteme unterschiedliche Anteile an ASIC3-immunreaktiven Afferenzen aufweisen.

4.3 Kritische Betrachtung des Versuchsaufbaus

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen und Interpretationen müssen trotz sorgfältiger Durchführung kritisch hinterfragt werden. So soll als Erstes ein Augenmerk auf evtl. Fehlerquellen hingewiesen werden, die beim retrograden Pleuratracing aufgetreten sein könnten. Zunächst einmal wurden mit hoher Wahrscheinlichkeit auch nicht-pleurale Afferenzen retrograd markiert. Zu ihnen können Afferenzen des Perikards oder der Lunge zählen. Da das Perikard u.a. durch den N. phrenicus innerviert wird, wurden DRG-Neurone in den Segmenthöhen, in denen die Perikarya der Afferenzen dieses Nervs liegen, nicht ausgewertet. Die Segmenthöhen, in denen Perikarya von spinalen Afferenzen des Perikards sowie der Lunge und Pleura lokalisiert sind, überschneiden sich teilweise. Deshalb könnten einige kardiale und pulmonale als pleurale Afferenzen fehlgedeutet worden sein. Perikarya kardialer Afferenzen weisen jedoch einen geringeren Anteil an Neuronen mit einem Durchmesser $<30 \mu\text{m}$ auf (24 %) als die in dieser Arbeit retrograd markierten und als pleurale Afferenzen gedeuteten Neurone (47 %) (Rola et al., 2003). Unterschiedliche immunhistochemische Charakteristika bzgl. des Anteils und der Verteilung pH-sensitiver Ionenkanäle zwischen pleuralen (diese Arbeit) und pulmonalen Afferenzen (Helbig et al., 2005; Groth et al., 2006) deuten ebenfalls auf eine Vernachlässigbarkeit dieser Fehlerquelle hin.

Des Weiteren kann die ASIC3- und TRPV1-Expression in DRG-Neuronen unter inflammatorischen Bedingungen gesteigert werden (Mamet et al., 2002; Schicho et al., 2004). Durch die Tracerapplikation in den Pleuraspalt kam es nämlich, wie bereits dargestellt wurde, zu einer Entzündungsreaktion (Abb. 10). Hierdurch könnte in dieser Arbeit der Anteil pH-sensitiver Ionenkanäle höher ausgefallen sein, als er unter nicht-inflammatorischen Bedingungen wäre. Weiterhin wurden die Ggl. stellata der Ratten, welche nach Thorakotomie den Tracer Dil in den Pleuraspalt verabreicht bekamen, in einer anderen Arbeit auf NF- κ -B-Aktivierung untersucht. NF- κ -B ist ein Transkriptionsfaktor, der u.a. Gene der Entzündung reguliert. Seine Aktivität war sechs Tage nach dem Pleuratracing im Gegensatz zu Kontrolltieren erhöht (Löw et al., 2004). Aus diesen Gründen müssen die immunhistochemischen Ergebnisse dieser Arbeit kritisch bzgl. einer möglichen Beeinflussung durch inflammatorische Prozesse betrachtet werden.

4.4 Ausblick auf eine mögliche Bedeutung von pleuralen Afferenzen unter klinisch-therapeutischen Gesichtspunkten

Die erhobenen Befunde könnten durchaus klinische Relevanz bei der Therapie pleuraler Schmerzen erlangen. Durch genauere Kenntnisse, welche neuronalen Faktoren an der Entstehung pleuraler Schmerzen beteiligt sind, könnten diese gezielt medikamentös behandelt werden. In dieser Arbeit wurden zwei pH-sensitive Ionenkanäle in pleuralen Afferenzen identifiziert, welche an nozizeptiven Prozessen partizipieren könnten. Für beide Ionenkanäle sind Stoffe bekannt, welche aktivitätsmodulierend wirken.

Insbesondere das Amilorid, welches hemmend auf ASICs wirkt (Kellenberger et Schild, 2002) und bestimmte NSAIDs, die einen inhibitorischen Effekt auf ASICs ausüben (Voiley et al., 2001), könnten in Zukunft eine Rolle bei der Therapie pleuraler Schmerzen spielen.

Durch den potenten TRPV1-Agonist Resiniferatoxin konnten im Tierexperiment selektiv nozizeptive Neurone ausgeschaltet werden: So führt eine periphere Applikation zu einer reversiblen, eine intraganglionäre Applikation zu einer irreversiblen Ausschaltung von Nozizeptoren (Karai et al., 2004).

Die hier genannten Stoffe sind nur eine kleine Auswahl bisher bekannter auf pH-sensitive Ionenkanäle wirkende Substanzen, welche bei der Therapie pleuraler Schmerzen in Zukunft zur Anwendung kommen könnten.

Diese Arbeit hat des Weiteren neue Erkenntnisse über Neuronsubpopulation und Faserqualitäten pleuraler Afferenzen erbracht. Solche Erkenntnisse könnten bei der Schmerztherapie pleuraler Erkrankungen insofern von Bedeutung sein, als dass verschiedene Neuronsubpopulationen für unterschiedliche Schmerzqualitäten verantwortlich sein sollen. So sollen nozizeptive A-Fasern eher einen stechenden, gut lokalisierbaren Schmerz (somatischer Schmerz), C-Fasern einen dumpfen, schlecht lokalisierbaren Schmerz (viszeraler Schmerz) vermitteln (Lawson, 2002). Durch das Wissen, welche Faktoren in welchen Fasern für die Schmerzempfindung verantwortlich sind, könnten bestimmte Schmerzqualitäten gezielter therapiert werden.

Diese Arbeit legt lediglich die Grundlage für evtl. klinisch relevante Anwendungen. Für eine mögliche klinische Durchführung der genannten Ausblicke müssten sicherlich noch zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen und klinische Studien durchgeführt werden. Auch bleibt an dieser Stelle anzumerken, dass die

Untersuchungen an Ratten durchgeführt wurden. Eine Übertragung der Ergebnisse von Nagetieren auf den Menschen ist aber nicht unbedingt ohne Weiteres möglich.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals pleurale Afferenzen retrograd markiert. Mittels einer Vierfachmarkierung mit dem Tracer Dil, einem Marker myelinisierter Neurone (anti-NF68), Antikörpern gegen die pH-sensitiven Ionenkanäle ASIC3 und TRPV1 sowie durch Größenbestimmung des Perikaryons konnten diese Afferenzen bzgl. ihrer Faserqualität und pH-Sensitivität untersucht werden.

Als Ergebnis konnte gezeigt werden, dass pleurale Afferenzen, deren Perikarya in thorakalen DRGs lokalisiert sind, in $A\alpha/\beta > A\delta$ - (6,5 %), $A\delta > A\alpha/\delta$ - (17,2 %) und C-Populationen (76,3 %) eingeteilt werden können. Diese Populationen konnten auf Grund ihrer Immunreaktivität für die pH-sensitiven Ionenkanäle ASIC3 und TRPV1 in weitere Subpopulationen unterteilt werden. Insgesamt wiesen 97 % der thorakalen Afferenzen mindestens einen der beiden pH-sensitiven Ionenkanäle auf.

Den untersuchten pleuralen Afferenzen könnte eine entscheidende Rolle bei der Generation von Pleuraschmerzen unter inflammatorischen Bedingungen zukommen. So könnten die verschiedenen Faserqualitäten für unterschiedliche Schmerzempfindungen verantwortlich sein. Darüber hinaus muss jedoch auch eine mögliche nicht-nozizeptive, mechanotransduktive Funktion dieser Afferenzen in Betracht gezogen werden. Eine Unterteilung in Neuronsubpopulationen, wie sie in dieser Arbeit vorgenommen wurde, könnte die Grundlage für differenzierte medikamentöse Therapiekonzepte bei Pleuraschmerzen darstellen.

Abstract

This is the first retrograde neuronal labelling study of pleural afferent neurons.

Retrogradely labelled dorsal root ganglion neurons were subjected to triple-labelling immunohistochemistry using antisera against ASIC3, TRPV1 and neurofilament 68 (marker for myelinated neurons), and their soma diameter was measured.

Pleural afferents with perikarya located in the thoracic dorsal root ganglia could be subdivided into three distinct classes: $A\alpha/\beta > A\delta$ - (6,5 %), $A\delta > A\alpha/\delta$ - (17,2 %) C-fibres (76,3 %). These classes could be subdivided into subclasses according to their expression of the pH-sensitive ion-channels ASIC3 and TRPV1. At least 97 % of the thoracic afferents expressed either one or both of those two ion-channels.

Pleural afferents may play an important role in generating pleural pain under inflammatory conditions. Distinct nerve-fibres could evoke distinct qualities of pain. However, the possibility of a mechanotransductive role of some of these afferents must also be considered.

Knowledge of the differential expression pattern of acid-sensitive channels in pleural afferents, as shown in the present study, may be helpful to manage pleural pain and to develop even more differentiated therapies in the future.

6 Anhang

Im Folgenden sind die immunhistochemischen Ergebnisse für jede Ratte und jedes ausgewertete DRG dargestellt. Folgende DRGs wurden während der Präparation beschädigt und finden sich deswegen nicht in der Auswertung: Ratte 2 Th6 (links), Ratte 3 Th3 (links) und Ratte 4 Th5 (links).

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20	1	0	0		1	
20-25	5	0	4		1	
25-30	1	0	0		1	
30-35						
35-40						
40-45						
gesamt	7	0	4		3	

Tab. 19.1: Ratte 1, Th3 links

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20	2		2			
20-25	7	2	2	0	1	1
25-30	9	3	3	0	1	2
30-35	3	1	1		1	
35-40						
40-45						
gesamt	21	6	8	0	3	3

Tab. 19.2: Ratte 1, Th4 links

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20						
20-25	6	1	1	0	2	1
25-30	1	1				
30-35						
35-40						
40-45						
gesamt	7	2	1	0	2	1

Tab. 19.3: Ratte1, Th5 links

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20						
20-25						
25-30	1	0		0		1
30-35						
35-40						
40-45						
gesamt	1	0		0		1

Tab. 19.4: Ratte 1, Th 6 links

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20						
20-25	2		2			
25-30	2	0		0		2
30-35	1	0		0		1
35-40						
40-45						
gesamt	5	0	2	0		3

Tab. 19.5: Ratte 2, Th3 links

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20						
20-25	1		1			
25-30	3		3			
30-35						
35-40						
40-45						
gesamt	4		4			

Tab. 19.6: Ratte 2, Th4 (links)

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20						
20-25	7	1	3		3	
25-30	3	1		0		0
30-35	2	2				
35-40	2	1		0		0
40-45	2	0		0		2
gesamt	16	5	3	5	3	5

Tab. 19.7: Ratte 2, Th5 (links)

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20						
20-25						
25-30	2	1		0		1
30-35	1	1				
35-40						
40-45						
gesamt	3	2		0		1

Tab. 19.8: Ratte 3, Th4 (links)

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20						
20-25						
25-30	1	0		0		1
30-35						
35-40						
40-45						
gesamt	1	0		0		1

Tab. 19.9: Ratte 3, Th5 (links)

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20	1		1			
20-25	6	3	1	0	1	1
25-30	1					
30-35	2	1		0		1
35-40						
40-45						
gesamt	10	4	2	0	1	2

Tab. 19.10: Ratte 3, Th6 (links)

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20	1		1			
20-25	1	1				
25-30						
30-35	1	0	0		1	
35-40						
40-45						
gesamt	3	1	1		1	

Tab. 19.11: Ratte 4, Th3 (links)

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20						
20-25	2	1	1			
25-30						
30-35						
35-40						
40-45						
gesamt	2	1	1			

Tab. 19.12: Ratte 4, Th4 (links)

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20						
20-25	2	1	1			
25-30						
30-35	2	0		0		2
35-40	1	0		0		1
40-45						
gesamt	5	1	1	0		3

Tab. 19.13: Ratte 4, Th6 (links)

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20						
20-25						
25-30						
30-35						
35-40	1	0		0		1
40-45	1	0		0		1
gesamt	2	0		0		2

Tab. 19.14: Ratte 5, Th3 (links)

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20						
20-25	2		2			
25-30						
30-35						
35-40						
40-45						
gesamt	2		2			

Tab. 19.15: Ratte 5, Th4 (links)

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20						
20-25	1		1			
25-30	1		1			
30-35						
35-40						
40-45						
gesamt	2		2			

Tab. 19.16: Ratte 5, Th5 (links)

	Dil	ASIC3	TRPV1	NF68	ASIC3/ TRPV1	ASIC3/ NF68
<20						
20-25	1		1			
25-30	2	1	1			
30-35						
35-40						
40-45						
gesamt	3	1	2			

Tab. 19.17: Ratte 5, Th6 (links)

7 Literatur

- Agostoni, E., F. Bodega, L. Zocchi. 2002. Albumin transcytosis from the pleural space. *J Appl Physiol* 93: 1806-1812.
- Ahern, G.P., L.S. Premkumar. 2002. Voltage-dependent priming of rat vanilloid receptor: effects of agonist and protein kinase C activation. *J Physiol* 545(2): 441-451
- Albertine, K.H., J.P. Wiener-Kronish, P.J. Roos, N.C. Staub. 1982. Structure, blood supply, and lymphatic vessels of the sheep's visceral pleura. *Am J Anat* 165(3): 277-294.
- Albertine, K.H., J.P. Wiener-Kronish, N.C. Staub. 1984. The structure of the parietal pleura and its relationship to pleural liquid dynamics in sheep. *Anat Rec* 208(3): 401-409.
- Al-Chalabi, A., C.C. Miller. 2003. Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays* 25(4): 346-355.
- Amann, R., C.A. Maggi. Ruthenium red as a capsaicin antagonist. 1991. *Life Sci* 49(12): 849-856.
- Antony, V.B.. 2003. Immunological mechanisms in pleural disease. *Eur Respir J* 21(3): 539-544.
- Betts, J.C., W.P. Blackstock, M.A. Ward, B.H. Anderton. 1997. Identification of phosphorylation sites on neurofilament proteins by nanoelectrospray mass spectrometry. *J Biol Chem* 272(20): 12922-12927.
- Bevan, S., S. Hothi, G. Hughes, I.F. James, H.P. Rang, K. Shah, C.S. Walpole, J.C. Yeats. 1992. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol* 107(2): 544-552.
- Bhave, G., H.-J. Hu, K.S. Glauner, W. Zhu, H. Wang, D.J. Brasier, G.S. Oxford, R.W. Gereau. 2003. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci USA* 100(21): 12480-12485.
- Birder, L.A., A.J. Kanai, W.C. de Groat, S. Kiss, M.L. Nealen, N.E. Burke, K.E. Dineley, S. Watkins, I.J. Reynolds, M.J. Caterina. 2001. Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(23): 13396-13401.
- Brown, H.G., J.H. Hoh. 1997. Entropic exclusion by neurofilament sidearms: a mechanism for maintaining interfilament spacing. *Biochemistry* 36(49): 15035-15040.
- Carter, J., A. Gragerov, K. Konvicka, G. Elder, H. Weinstein, R.A. Lazzarini. 1998. Neurofilament (NF) assembly; divergent characteristics of human and rodent NF-L subunits. *J Biol Chem* 273(9): 5101-5108.

Caterina, M.J., M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, D. Julius. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389(23): 816-824.

Caterina, M.J., A. Leffler, A.B. Malmberg, W.J. Martin, J. Trafton, K.R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A.I. Basbaum, D. Julius. 2000. Impaired nociception and pain in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288(5464): 306-313.

Chan, C.L., P. Facer, J.B. Davis, G.D. Smith, J. Egerton, C. Bountra, N.S. Williams, P. Anand. 2003. Sensory fibres expressing capsaicin receptor TRPV1 in patients with rectal hypersensitivity and faecal urgency. *Lancet* 361(9355): 385-391.

Chen, C.C., A. Zimmer, W.H. Sun, J. Hall, M.J. Brownstein, A. Zimmer. 2002. A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(13): 8992-8997.

Clapham, D.E. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426(6966): 517-524.

Coscoy, S., J.R. de Weille, E. Lingueglia, M. Lazdunski. 1999. The pre-transmembrane 1 domain of acid-sensing ion channel participates in the ion pore. *J Biol Chem* 274(15): 10129-10132.

Coulombe, P.A., L. Ma, S. Yamada, M. Wawersik. 2001. Intermediate filaments at a glance. *J Cell Sci* 114 (Pt 24): 4345-4347.

Davis, J.B., J. Gray, M.J. Gunthorpe, J.P. Hatcher, P.T. Davey, P. Overend, M.H. Harries, J. Latcham, C. Clapham, K. Atkinson, S.A. Hughes, K. Rance, E. Grau, A.J. Harper, P.L. Pugh, D.C. Rogers, S. Bingham, A. Randall, S.A. Sheardowns. 2000. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405(6783): 183-187.

Di Marzo, V.. Signalling at vanilloid TRPV1 channels. 2004. *Eur J Biochem* 271: 1813.

Djoughri, L., S.N. Lawson. 2004. Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 46(2): 131-145.

Dray, A., C.A. Forbes, G.M. Burgess. 1990. Ruthenium red blocks the capsaicin-induced increase in intracellular calcium and activation of membrane currents in sensory neurones as well as the activation of peripheral nociceptors in vitro. *Neurosci Lett* 110(1-2): 52-59.

Drenckhahn, D.. 1994. Zytoskelett, Zilien, Zentriolen. In „Benninghoff Anatomie, 15. Auflage“, pp. 33-45. *Urban & Schwarzenberg München-Wien-Baltimore*.

Drew, L.J., D.K. Rohrer, M.P. Price, K.E. Blaver, D.A. Cockayne, P. Cesare, J.N. Wood. 2004. Acid-sensing ion channels ASIC2 and ASIC3 do not contribute to mechanically activated currents in mammalian sensory neurones. *J Physiol* 556(3): 691-710.

- Duijvestijn, A.M., H. van Goor, F. Klatter, G.D. Majoor, E. van Bussel, P.J. van Breda Vriesman. 1992. Antibodies defining rat endothelial cells: RECA-1, a pan-endothelial cell-specific monoclonal antibody. *Lab Invest* 66(4): 459-466.
- Duncker, H.R.. 1994. Atemapparat (Apparatus respiratorius). In „Benninghoff Anatomie, Band 1, 15. Auflage“, pp. 529-587. *Urban & Schwarzenberg München-Wien-Baltimore*.
- Dvorakova, M., W. Kummer. 2001. Transient expression of vanilloid receptor subtype 1 in rat cardiomyocytes during development. *Histochem Cell Biol* 116(3): 223-225.
- Eliskova, M., O. Eliska, A.J. Miller. 1995. The lymphatic drainage of the parietal pericardium in man. *Lymphology* 28(4): 208-217.
- Ferreira, J., G.L. da Silva, J.B. Calixto. 2004. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. *Br J Pharmacol* 141(5): 787-794.
- Ferrer-Montiel, A., C. Garcia-Martinez, C. Morenilla-Palao, N. Garcia-Sanz, A. Fernández-Carvajal, G. Fernández-Ballester, R. Planells-Cases. 2004. Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur J Biochem* 271(10): 1820-1826.
- Fleischhauer, K.. 1994. Das Herz. In „Benninghoff Anatomie, Band 1, 15. Auflage“, pp. 617-651. *Urban & Schwarzenberg München-Wien-Baltimore*.
- Fuchs, E., D.W. Cleveland. 1998. A structural scaffolding of intermediate filament in health and disease. *Science* 279(5350): 514-519.
- Gaetgens, P.. 2001. Das Kreislaufsystem. In “Klinke, Silbernagl: Lehrbuch der Physiologie, 3., vollständig überarbeitete Auflage“, pp. 145-188. *Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York*.
- García-Martínez, C., C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, J.M. Merino, A. Ferrer-Montiel. 2000. Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J Biol Chem* 275(42): 32552-32558.
- Garcia-Sanz, N., A. Fernandez-Carvajal, C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, E. Fajardo-Sanchez, G. Fernandez-Ballester, A. Ferrer-Montiel. 2004. Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci* 24(23): 5307-5314.
- Gasser, H.S.. 1945. Mammalian nerve fibers. Nobel lecture, December 12, 1945. In “Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1942-1962“, pp. 34-47. *Elsevier Publishing Company Amsterdam, 1964*.
- Gava, N.R., L. Klionsky, Y. Qu, L. Shi, R. Tamir, S. Edenson, T.J. Zhang, V.N. Viswanadhan, A. Toth, L.V. Pearce, T.W. Vanderah, F. Porreca, P.M. Blumberg, J. Lile, Y. Sun, K. Wild, J.-C. Louis, J.J.S. Treanor. 2004. Molecular Determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem* 279(19): 20283-20295.

Geisler, N., E. Kaufmann, S. Fischer, U. Plessmann, K. Weber. 1983. Neurofilament architecture combines structural principles of intermediate filaments with carboxy-terminal extensions in size between triplet proteins. *EMBO J* 2(8): 1295-1302.

Goshgarian, H.G., J.A. Rafols. 1981. The phrenic nucleus of the albino rat: a correlative HRP and Golgi study. *J Comp Neurol* 201(3): 441-456.

Groth, M., T. Helbig, V. Grau, W. Kummer, R.V. Haberberger. 2006. Spinal afferent neurons projecting to the rat lung and pleura express acid sensitive channels. *Resp Res* 7: 96.

Hauner, H., W.A. Scherbaum. 1999. Stoffwechselstörungen: Diabetes mellitus. In „Thieme`s Innerer Medizin“, pp. 288-310. *Thieme Stuttgart – New York*.

Hayes, P., H.J. Meadows, M.J. Gunthorpe, M.H. Harries, D.M. Duckworth, W. Cairns, D.C. Harrison, C.E. Clarke, K. Ellington, R.K. Prinjha, A.J.L. Barton, A.D. Medhurst, G.D. Smith, S. Topp, P. Murdock, G.J. Sanger, J. Terret, O. Jenkins, C.D. Benham, A.D. Randall, I.S. Gloger, J.B. Davis. 2000. Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* 88(2): 205-215.

Heiner, I., J. Eisfeld, C.R. Halaszovich, E. Wehage, E. Jungling, C. Zitt, A. Luckhoff. 2003. Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: evidence for currents through long TRP channel 2 induced by ADP-ribose and NAD. *Biochem J* 371(3): 1045-1053.

Helbig, T., M. Groth, M. Bodenbrenner, S. Wiegand, V. Grau, R.V. Haberberger, W. Kummer. 2005. Die Lunge und Pleura innervierenden Spinalganglienneurone sind pH-sensitiv. Eine Tracingstudie. *Verh Anat Ges* 100: p. 262.

Herrmann, H.. 2002. Stress-Fänger und Chromatin-Organisatoren: Hochdynamischen intrazellulären Filamentsystemen auf der Spur. *BIOspektrum* 5/02: 597-601.

Hildebrand, M.S., M.G. de Silva, T. Klockars, E. Rose, M. Price, R.J.H. Smith, W.T. McGuirt, H. Christopoulos, C. Petit, H.H. M. Dahl. Characterisation of DRASIC in the mouse inner ear. 2004. *Hear Res* 190(1-2): 149-160.

Hirokawa, N., S. Takeda. 1998. Gene targeting studies begin to reveal the function of neurofilament protein. *J Cell Biol* 143(1): 1-4.

Hisanaga, S., N. Hirokawa. 1988. Structure of the peripheral domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing. *J Mol Biol* 202(2): 297-305.

Hoffman, P.N., R.J. Lasek. 1975. The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J Cell Biol* 66(2): 351-266.

Hoffman, P.N., J.W. Griffin, D.L. Price. 1984. Control of axonal caliber by neurofilament transport. *J Cell Biol* 99(2): 705-714.

Hoffman, P.N., D.W. Cleveland, J.W. Griffin, P.W. Landes, N.J. Cowan, D.L. Price. 1987. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(10): 3472-3476.

Honig, M.G., R.I. Hume. 1986. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J Cell Biol* 103(1): 171-187.

Huang, S.M., T. Bisogno, M. Trevisani, A. Al-Hayani, L. De Petrocellis, F. Fezza, M. Tognetto, T.J. Petros, J.F. Krey, C.J. Chu, J.D. Miller, S.N. Davies, P. Geppetti, J.M. Walker, V. Di Marzo. 2002. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(12): 8400-8405.

Hurst, J., D. Flavell, J.P. Julien, D. Meijer, W. Mushynski, F. Grosveld. 1987. The human neurofilament gene (NEFL) is located on the short arm of chromosome 8. *Cytogenet Cell Genet* 45(1): 30-32.

Hwang, S.W., H. Cho, J. Kwak, S.Y. Lee, C.J. Kang, J. Jung, S. Cho, K.H. Min, Y.G. Suh, D. Kim, U. Oh. 2000. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(11): 6155-6160.

Immke, D.C., E.W. McClesky. 2001. Lactate enhances the acid-sensing Na⁺ channel on ischemia-sensing neurons. *Nat Neurosci* 4(9): 869-870.

Immke, D.C., E.W. McClesky. 2003. Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca²⁺ blockade. *Neuron* 37(1): 75-84.

Ingram, R.H.. 1987. Diseases of the pleura, mediastinum, and diaphragm. In "Harrison's Principles of Internal Medicine 2, Eleventh Edition", pp. 1123-1129. McGraw-Hill Book Company New York, St. Louis, San Francisco, Auckland, Bogotá, Hamburg, London, Madrid, Mexico, Milan, Montreal, New Delhi, Panama, Paris, Sao Paulo, Singapore, Sydney, Tokyo, Toronto.

Jacobus, W.E., H.J. Taylor, D.P. Hollis, R.L. Nunnally. 1977. Phosphorus nuclear magnetic resonance of perfused working rat hearts. *Nature* 265(5596): 756-758.

Jaffe, H., Veerenna, K.T. Shetty, H.C. Pant. 1998. Characterization of the phosphorylation sites of human high molecular weight neurofilament protein by electrospray ionization tandem mass spectrometry and database searching. *Biochemistry* 37(11): 3931-3940.

Jammes, Y., D. Trousse, S. Delpierre. 2005. Identification and properties of parietal pleural afferents in rabbits. *J Physiol* 567(Pt 2): 641-650.

Jones, J.S.. 2001. The pleura in health and disease. *Lung* 179(6): 397-413.

Jones, N.G., R. Slater, H. Cadiou, P. McNaughton, S.B. McMahon. 2004. Acid-induced pain and its modulation in humans. *J Neurosci* 24(48): 10974-10979.

- Jung, J., S.W. Hwang, J. Kwak, S.-Y. Lee, C.J. Kang, W.B. Kim, D. Kim, O. U. 1999. Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J Neurosci* 19(2): 529-538.
- Jung, J., J.S. Shin, S.-Y. Lee, S.W. Hwang, J. Koo, H. Cho, U. Oh. 2004. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem* 279(8): 7048-7054.
- Karai, L., D.C. Brown, A.J. Mannes, S.T. Connelly, J. Brown, M. Gandal, O.M. Wellisch, J.K. Neubert, Z. Olah, M.J. Iadarola. 2004. Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. *J Clin Invest* 113(9): 1344-1352.
- Kedei, N., T. Szabo, J.D. Lile, J.T. Treanor, Z. Olah, M.J. Iadarola, P.M. Blumberg. 2001. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 276(30): 28613-28619.
- Kellenberger, S., L. Schild. 2002. Epithelial Sodium Channel/Degenerin Family of Ion Channels: A Variety of Functions for a Shared Structure. *Physiol Rev* 82: 735-767.
- Khaisman, E.B.. 1975a. Cholinergic and adrenergic innervation of the microvessels of serous membranes. *Biull Eksp Med* 79(3): 106-110.
- Khaisman, E.B.. 1975b. A histochemical study of vegetative innervation of blood-vessels of serosa. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 64(4): 337-358.
- Kleinsorg, H., H. Finke. 1989. Erkrankungen der Atmungsorgane. In „Lehrbuch der Inneren Medizin, Band 2, 5. Auflage“, pp. 495-615. *VEB Gustav Fischer Verlag Jena*.
- Klinke, R..2001. Bauelemente des Nervensystems. In “Klinke, Silbernagl: Lehrbuch der Physiologie, 3., vollständig überarbeitete Auflage“, pp. 539-552. *Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York*.
- Kollarik, M., B.J. Udem. 2003. Activation of bronchopulmonary vagal afferent nerves with bradykinin, acid and vanilloid receptor agonists in wild-type and TRPV1^{-/-} mice. *J Physiol* 555(1): 115-123.
- Kondoh, M., T. Kasai, M. Shimada, M. Kashiwayanagi, H. Yokosawa. 2003. cDNA cloning and characterization of an osmotically sensitive TRP channel from ascidian eggs. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 134(3): 417-423.
- Koolman, J., K.-H. Röhm. 1998. Cytoskelett: Komponenten. In „Taschenatlas der Biochemie, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage“, pp.198-199. *Thieme Stuttgart New York*.
- Krishtal, O..2003. The ASICs: signaling molecules? Modulators? *Trends Neurosci* 26(9): 477-483.
- Kubik, S.. 1993. Anatomie des Lymphgefäßsystems. In „Lehrbuch der Lymphologie, 3. Auflage“, pp. 1-198. *Gustav Fischer Verlag Stuttgart – Jena – New York*.

- Kumar, S., X. Yin, B.D. Trapp, J.H. Hoh, M.E. Paulaitis. 2002a. Relating Interactions between Neurofilaments to the Structure of Axonal Neurofilament Distributions through Polymer Brush Models. *Biophys J* 82(5): 2360-2372.
- Kumar, S., X. Yin, B.D. Trapp, M.E. Paulaitis, J.H. Hoh. 2002b. Role of Long-Range Repulsive Forces in Organizing Axonal Neurofilament Distributions: Evidence From Mice Deficient in Myelin-Associated Glycoprotein. *J Neurosci Res* 68(6): 681-690.
- Kummer, W., A. Fischer, R. Kurkowski, C. Heym. 1992. The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience* 49(3): 715-737.
- Kwak, J.Y., J.Y. Jung, S.W. Hwang, W.T. Lee, U. Oh. 1998. A capsaicin-receptor antagonist, capsazepin, reduces inflammation-induced hyperalgesic responses in the rat: evidence for an endogenous capsaicin-like substance. *Neuroscience* 86 (2): 619-626.
- Lawson, S.N., P.J. Waddell. 1991. Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *J Physiol* 435: 41-63.
- Lawson, S.N.. 2002. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, A δ - or A α / β -fibres. *Exp Physiol* 87(2): 239-244.
- Lee, K.H., K. Chung, J.M. Chung, R.E. Coggeshall. 1986. Correlation of cell body size, axon size, and signal conduction velocity for individually labelled dorsal root ganglion cells in the cat. *J Comp Neurol* 243(3): 335-346.
- Leonhardt, H.. 1987. Atmungssystem. In "Rauber/Kopsch. Anatomie des Menschen. Lehrbuch und Atlas. Band 2: Innere Organe", pp. 127-191. Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York.
- Leterrier, J.F., J. Käs, J. Hartwig, R. Vegners, P.A. Janmey. 1996. Mechanical effects of neurofilament cross-bridges. Modulation by phosphorylation, lipids, and interactions with F-actin. *J Biol Chem* 271(26): 15687-15694.
- Liman, E.R., D.P. Corey, C. Dulac. 1999. TRP2: A candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(10): 5791-5796.
- Lingueglia, E., J.R. de Weille, F. Bassilana, C. Heurteaux, H. Sakai, R. Waldmann, M. Lazdunski. 1997. A Modulatory Subunit of Acid Sensing Ion Channels in Brain and Dorsal Root Ganglion Cells. *J Biol Chem* 272(47): 29778-29783.
- Löw, J., V. Grau, T. Helbig, M. Groth, W. Kummer, R. Vollerthun. 2004. NF- κ -B Aktivierung in postganglionären sympathischen Neuronen der Ratte nach operativem Eingriff. Poster auf der 21. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg vom 29.09.-01.10.2004.

- Ma, Q.-P.. 2002. Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats. *Neurosci Lett* 319(2): 87-90.
- Mandadi, S., M. Numazaki, M. Tominaga, M.B. Bhat, P.J. Armati, B.D. Roufogalis. 2004. Activation of protein C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium* 35(5): 471-478.
- Mariassy, A.T., E.B. Wheeldon. 1983. The pleura: a combined light microscopic, scanning, and transmission electron microscopic study in the sheep. I. Normal pleura. *Exp Lung Res* 4(4): 293-314.
- Martinez, R.V., M. Reval, M.D. Campos, J.A. Terron, R. Dominguez, F.J. Lopez-Munoz. 2002. Involvement of periphil cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in inflammatory pain. *J Pharm Pharmacol* 54(3): 405-412.
- Maxfiels, F.R., T.E. McGraw. 2004. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell.* 5(2): 121-132.
- Mendell, J.R., Z. Sahenk. 2003. Painful sensory neuropathy. *N Engl J Med* 348(13): 1243-1255.
- Minke, B.. 1977. Drosophila mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech* 3(1): 59-64.
- Minke, B.. 1982. Light-induced reduction in excitation efficiency in the trp mutant of Drosophila. *J Gen Physiol* 79(3): 361-385.
- Miserocchi, G.. 1997. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J* 10(1): 219-225.
- Mixer, R.L.. 1941. On macrophagal foci ("milky spots") in the pleura of different mammals, including man. *Am J Anat* 69: 156-186.
- Molecular Probes: Product information – lipophilic tracers DiI, DiO, DiD, DiA, and DiR. 25. 2005. <http://www.probes.invitrogen.com/media/pis/mp00282.pdf> (revised 25 october 2005)
- Molecular Probes: The Handbook – A guido to fluorescent probes and labeling technologies. 2006. <http://www.probes.invitrogen.com/handbook/figures/0912.html> (updatet: January 22, 2006)
- Molliver, D.C., D.C. Immke, L. Fierro, M. Paré, F.L. Rice, E.W. McCleskey. 2005. ASIC3, an acid-sensig ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons. *Molecular Pain*: 1: 35.
- Morris, J.R., R. J. Lasek. 1982. Stable polymers of the axonal cytoskeleton: The axoplasmic ghost. *J Cell Biol* 92(1): 192-198.
- Motavkin, P.A., M.V. Zuga, V.F. Baranov, E.V. Eliseeva, V.A. Nevzorova. 1997. The monoaminergic innervation of the mediastinal pleura in human fetuses. *Morfolgiia* 111(1): 43-46.

- Mozell, E.J., S. Sabanathan, A.J. Mearns, P.J. Bickford-Smith, M.R. Majid, G. Zografos. 1991. Continuous extrapleural intercostal nerve block after pleurectomy. *Thorax* 46(1): 21-24.
- Murkherjee, S., T.T. Soe, F.R. Maxfield. 1999. Endocytic Sorting of Lipid Analogues Differing Solely in the Chemistry of their Hydrophobic Tails. *J Cell Biol* 144(6): 1271-1284.
- Nagy, I., H.P. Rang. 1999. Similarities and differences between the responses of rat sensory neurons to noxious heat and capsaicin. *J Neurosci* 19(24): 10647-10655.
- Nakatani, T., H. Shinohara, Y. Fukuo, S. Morisawa, T. Matsuda. 1988. Pericardium of rodents: pores connect the pericardial and pleural cavities. *Anat Rec* 220(2): 132-137.
- Negrini, D., S.T. Ballard, J.N. Benoit. 1994. Contribution of lymphatic myogenic activity and respiratory movements to pleural lymph flow. *J Appl Physiol* 76(6): 2267-2274.
- Negrini, D., M. Del Fabbro. 1999. Subatmospheric pressure in the rabbit pleural lymphatic network. *J Physiol* 520(3): 761-769.
- Noppen, M., M. de Waele, R. Li, K.V. Gucht, J. D'Haese, E. Gerlo, W. Vincken. 2000. Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined by pleural lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 162 (3 Pt 1): 1023-1026.
- Numazaki, M., T. Tominaga, K. Takeuchi, N. Murayama, H. Toyooka, M. Tominaga. 2003. Structural determination of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci* 100(13): 8002-8006.
- Olah, Z., T. Szabo, L. Karai, C. Hough, R.D. Fields, R.M. Caudle, P.M. Blumberg, M.J. Iadarola. 2001. Ligand-induced dynamic membrane changes and cell deletion conferred by vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 276(14): 11021-11030.
- Omary, M.B., P.A. Coulombe, W.H.I. McLean. 2004. Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med* 351(20): 2087-2100.
- Patterson, L.M., H. Zheng, S.M. Ward, H.-S. Berthoud. 2003. Vanilloid receptor (VR1) expression in vagal afferent neurons innervating the gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 311(3): 277-287.
- Pauling, L., R.B. Corey, H.R. Branson. 1951. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 37(4): 205-211.
- Perez, C.A., L. Huang, M. Rong, J.A. Kozak, A.K. Preuss, H. Zhang, M. Max, R.F. Margolskee. 2002. A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* 5(11): 1169-1176.

Perez, C.A., R.F. Margolskee, S.C. Kinnamon, T. Ogura. 2003. Making sense with TRP channels: store-operated calcium entry and the ion channel Trpm5 in taste receptor cells. 2003. *Cell Calcium* 33(5-6): 541-549.

Premkumar, L.S., G.P. Ahern. 2000. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 408(6815): 985-990.

Premkumar, L.S., S. Agarwal, D. Steffen. 2002. Single-channel properties of native and cloned rat vanilloid receptors. *J Physiol* 545(1): 107-117.

Prescott, E.D., D. Julius. 2003. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* 300(5623): 1284-1288.

Price, M.P., S.L. McIlwrath, J. Xie, C. Cheng, J. Qiao, D.E. Tarr, K.A. Sluka, T.J. Brennan, G.R. Lewin, M.J. Welsh. 2001. The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron* 32(6): 1071-1083.

Price, M.P., R.J. Thompson, J.O. Eshcol, J.A. Wemmie, C.J. Benson. 2004. Stomatin modulates gating of acid-sensing ion channels. *J Biol Chem* 279(51): 53886-53891.

Putz, R.. 1994. Spezieller Bewegungsapparat: Rumpf. In „Benninghoff Anatomie, Band 1, 15. Auflage“, pp. 617-651. *Urban & Schwarzenberg München-Wien-Baltimore*.

Quigg, M., L.G. Elvin, H. Aldskogius. 1988. Distribution of cardiac sympathetic afferent fibers in the guinea pig heart labeled by anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase. *J Auton Nerv Syst* 25(2-3): 107-118.

Reilly, C.A., J.L. Taylor, D.L. Lanza, B.A. Carr, D.J. Crouch, G.S. Yost. 2003. Capsaicinoids cause inflammation and epithelial cell death through activation of vanilloid receptors. *Toxicol Sci* 73(1): 170-181.

Renton, T., Y. Yiangou, P.A. Baecker, A.P. Ford, P. Anand. 2003. Capsaicin receptor VR1 and ATP purinoceptor P2X3 in painful and nonpainful human tooth pulp. *J Orofac Pain* 17(3): 245-250.

Rola, R., G. Witkowski, P.J. Szulczyk. 2003. Voltage-dependent K⁺ currents in rat cardiac dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 119(1): 181-191.

De la Rosa, D.A., P. Zhang, D. Shao, F. White, C.M. Canessa. 2002. Functional implications of the localization and activity of acid-sensitive channels in rat peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(4): 2326-2331.

Sanchez, J.F., J.E. Krause, D.N. Cortright. 2001. The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience* 107(3): 373-381.

Scheid, P..2001. Atmung. In "Klinke, Silbernagl: Lehrbuch der Physiologie, 3., vollständig überarbeitete Auflage", pp. 217-272. *Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York*.

Schicho, R., W. Florian, I. Liebmann, P. Holzer, I.T. Lippe. 2004. Increased expression of TRPV1 receptor in dorsal root ganglia by acid insult of the rat gastric mucosa. *Eur J Neurosci* 19(7): 1811-1818.

Schlaepfer, W.W., L.A. Freeman. 1978. Neurofilament proteins of rat peripheral nerve and spinal cord. *J Cell Biol* 78(3): 653-662.

Shin, J., H. Cho, S.W. Hwang, J. Jung, C.Y. Shin, S.-Y. Lee, S.H. Kim, M.G. Lee, Y.H. Choi, J. Kim, N.A. Haber, D.B. Reichling, S. Khasar, J.D. Levine, U. Oh. 2002. Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(15): 10150-10155.

Shinohara, H.. 1997. Distribution of lymphatic stomata on the pleural surface of the thoracic cavity and the surface topography of the pleural mesothelium in the golden hamster. *Anat Rec* 249(1): 16-23.

Sidi, S., R.W. Friedrich, T. Nicolson. 2003. NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science* 301(5629): 96-99.

Sluka, K.D., M.P. Price, N.M. Breese, C.L. Stucky, J.A. Wemmie, M.J. Welsh. 2003. Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. *Pain* 106(3): 229-239.

Smart, D., M.J. Gunthorpe, J.C. Jerman, S. Nasir, J. Gray, A.I. Muir, J.K. Chambers, A.D. Randall, J.B. Davis. 2000. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol* 129 (2): 227-230.

Snider, W.D., S.B. McMahon. 1998. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 20(4): 629-632.

Song, A., D.J. Tracey, K.W. Ashwell. 1999. Development of the rat phrenic nerve and the terminal distribution of phrenic afferents in the cervical cord. *Anat Embryol (Berl)* 200(6): 625-643.

Southall, M.D., T. Li, L.S. Gharibova, Y. Pei, G.D. Nicol, J.B. Travers. 2003. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 304(1): 217-222.

Springall, D.R., A. Cadieux, H. Oliveira, H. Su, D. Royston, J.M. Polak. Retrograde tracing shows that CGRP-immunoreactive nerves of rat trachea and lung originate from vagal and dorsal root ganglia. *J Auton Nerv Syst* 20(2): 155-166.

van der Stelt, M., V. Di Marzo. 2004. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem* 271(10): 1827-1834.

Stevens, A., J. Lowe. 1997. „Histologie des Menschen, 2. Auflage“, pp. 26, 85. *Chapman & Hall London-Glasgow-Weinheim-New York-Tokyo-Melbourne-Madras*.

Steinert, P.M., D.R. Roop. 1988. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Ann Rev Biochem* 57: 593-625.

Stryer, L.. 1995. Konformation, Dynamik und Funktion von Proteinen: Signalübertragungsprozesse. In „Biochemie, 4. Auflage“, pp. 344-375. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford*.

Stryer, L.. 1995. Konformation, Dynamik und Funktion von Proteinen: Regulatorische Strategien. In „Biochemie, 4. Auflage“, pp. 249-275. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford*.

Stryer, L.. 1995. Der molekulare Bauplan des Lebens: Struktur und Funktion der Proteine. In „Biochemie, 4. Auflage“, pp. 17-184. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford*.

Sutherland, S.P., C.J. Benson, J.P. Adelman, E.W. McCleskey. 2001. Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*: 98(2) 711-716.

Szallasi, A., P.M. Blumberg. 1990. Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain Res* 524(1): 106-111.

Tasci, S., S. Ewig, B. Luderitz. 2004. Diagnose und Therapie von parapneumonischen Pleuraergüssen und Empyemen. *Ärzteblatt* 101(10): 638-648.

DeVries, K.L., H.G. Goshgarian. 1989. Spinal cord localization and characterization of the neurons which give rise to the accessory phrenic nerve in the adult rat. *Exp Neurol* 104(1): 88-90.

Tominaga, M., D. Julius. 2000. Capsaicin receptor in the pain pathway. *Jpn J Pharmacol* 83(1): 20-24.

Ugawa, S., T. Ueda, Y. Ishida, M. Nishigaki, Y. Shibata, S. Shimada. 2002. Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J Clin Invest* 110(8): 1185-1190.

Vilim, F.S., A.A. Aarnisalo, M.-J. Nieminen, M. Lintunen, K. Karlstedt, V.K. Kontinen, E. Kalso, B. States, P. Panula, E. Ziff. 1999. Gene for pain modulatory neuropeptide NPFF: Induction in spinal cord by noxious stimuli. *Mol Pharmacol* 55(5): 804-811.

Voilley, N., J. de Weille, J. Mamet, M. Lazdunski. 2001. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J Neurosci* 21(20): 8026-8033.

Waldmann, R., F. Bassilana, J. de Weille, G. Champigny, C. Heurteaux, M. Lazdunski. 1997. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *J Biol Chem* 272(34): 20975-20978.

Waldmann, R., M. Lazdunski. 1998. H⁺-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Curr Opin Neurobio* 8(3): 418-424.

Wang, N.S.. 1975. The preformed stomas connecting the pleural cavity and the lymphatics in the parietal pleura. *Am Rev Respir Dis* 111(1): 12-20.

- Wang, L., C.L. Ho, D. Sun, R.K. Liem, A. Brown. 2000. Rapid movement of axonal neurofilaments interrupted by prolonged pauses. *Nat Cell Biol* 2(3): 137-141.
- Ward, S.M., J. Bayguinov, K.J. Won, D. Grundy, H.R. Berthoud. 2003. Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* 465(1): 121-135.
- Watanabe, N., S. Horie, G.J. Michael, D. Spina, C.P. Page, J.V. Priestley. 2005. Immunohistochemical localization of vanilloid receptor subtype 1 (TRPV1) in the guinea pig respiratory system. *Pulm Pharmacol Ther* 18(3): 187-197.
- Wedekind, C.. 1997. Receptive properties of primary afferent fibres from rabbit pleura, in vitro. *Somatosens Mot Res* 14(4): 229-236.
- De Weille, J.R., F. Bassilani, M. Lazdunski, R. Waldmann. 1998. Identification, functional expression and chromosomal localisation of a sustained human proton-gated cation channel. *FEBS Lett* 433(3): 257-260.
- Werebe, E.C., B. Pazetti, J.R.M. de Campos, P.P. Fernandez, V.L. Capelozzi, F.B. Jatene, F.S. Vargas. 1999. Systemic distribution of talc after intrapleural administration in rats. *Chest* 115: 190-193.
- Xu, Z., J.R. Marszalek, M.K. Lee, P.C. Wong, J. Folmer, T.O. Crawford, S.-T. Hsieh, J.W. Griffin, D.W. Cleveland. 1996. Subunit Composition of Neurofilaments Specifies Axonal Diameter. *J Cell Biol* 133(5): 1061-1069.
- Yiangou, Y., P. Facer, A. Ford, C. Brady, O. Wiseman, C.J. Fowler, P. Anand. 2001. Capsaicin receptor VR1 and ATP-gated ion channel P2X3 in human urinary bladder. *BJU Int* 87(9): 774-779.
- Yin, X., T.O. Crawford, J.W. Griffin, P.-h. Tu, V. M.-Y. Lee, C. Li, J. Roder, B.D. Trapp. 1998. Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci* 18(6): 1953-1962.
- Zheng, F., S.N. Lawson. 1994. Immunocytochemical properties of rat renal afferent neurons in dorsal root ganglia: a quantitative study. *Neuroscience* 63(1): 295-306.
- Zocchi, L., E. Agostoni, D. Cremaschi. 1991. Electrolyte transporter across the pleura of rabbits. *Respir Physiol* 86(1): 125-138.
- Zocchi, L.. 2002. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J* 20(6): 1545-1558.

8 Danksagung

Folgenden Personen möchte ich für die Unterstützung dieser Arbeit danken:

An erster Stelle meinen Eltern, Brigitte und Klaus Groth, die mir mein Studium und damit auch die Ausführung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

Tanja Helbig für die gute Zusammenarbeit, Unterstützung und Motivation.

PD Dr. rer. physiol. Rainer V. Haberberger und Prof. Dr. med. Wolfgang Kummer für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende Betreuung.

PD Dr. rer. nat. Veronika Grau für die Hilfe bei der Durchführung des operativen Versuchsaufbaus.

Martin Bodenbenner, Petra Hartmann und Silke Wiegand für die sehr gute Einarbeitung in die Laborarbeit und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Dr. rer. biol. hum. Inke König und Dr. med. Peter König für die Hilfe bei der Statistik.

Guido Koch und Matthias Windhorst für die Unterstützung an so manchen Wochenenden.

Außerdem allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Anatomie und Zellbiologie für die äußerst kollegiale Atmosphäre.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Michael Groth
Geburtsdatum	08.01.1980
Geburtsort	Vechta
Familienstand	ledig

Schulbildung

08/1986 – 07/1990	Overbergschule Vechta, Grundschule
08/1990 – 06/1999	Kolleg St. Thomas der Dominikaner in Vechta, Gymnasium
06/1999	Abitur

Zivildienst

08/1999 – 06/2000	Andreaswerk Vechta
-------------------	--------------------

Hochschulbildung

09/2000 – 09/2005	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
09/2002	Ärztliche Vorprüfung
09/2003	Erstes Staatsexamen
09/2005	Zweites Staatsexamen
10/2005 – 09/2006	Praktisches Jahr am Klinikum Kassel, Lehrkrankenhaus der Philipps-Universität Marburg
10/2006	Drittes Staatsexamen

Veröffentlichungen

Groth M, Helbig T, Grau V, Kummer W, Haberberger RV. 2006. Spinal afferent neurons projecting to the rat lung and pleura express acid sensitive channels. *Resp Res* 7: 96.

Helbig T, Groth M, Bodenbenner M, Wiegand S, Grau V, Haberberger RV, Kummer W. 2005. Die Lunge und Pleura innervierenden Spinalganglienneurone sind pH-sensitiv. Eine Tracingstudie. *Verh Anat Ges* 100: 262 (Abstract).

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Michael Groth

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
ST AU FEN BER GRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5212-9



9 7 8 3 8 3 5 9 5 2 1 2 6