

**Hämoxigenase-2 und -1 während der pränatalen
Entwicklung in prä- und paravertebralen sympathischen
Ganglien der Maus.**

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

Vorgelegt von Martin Henzel
aus Frankfurt am Main

Gießen 2006

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Leiter: Prof. Dr. W. Kummer
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Dr. R. Vollerthun

Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer

Gutachter: Prof. Dr. L. Schmitz

Tag der Disputation: 27.03.2007

Für meine Eltern und meiner lieben Frau Jana

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	6
1.1 Hämmetabolismus	6
1.2 Hämoxygenasen: Biochemie, Struktur und Funktion	7
1.3 Kohlenmonoxid – ein intrazellulärer Mediator	9
1.4 Bilirubin – ein wirksames Antioxidans	10
1.5 Hämoxygenasen im Nervensystem	10
1.5.1 Hämoxygenasen im Zentralnervensystem	10
1.5.2 Hämoxygenasen im peripheren Nervensystem	11
1.5.3 Hämoxygenasen während der embryonalen Entwicklung	13
1.6 Fragestellung und Ziel	13
2. Material und Methoden	15
2.1 Mäusehaltung und –zucht	15
2.2 Gewebepreparation	15
2.3 Anfertigen von Gewebeschnitten	16
2.4 Immunhistochemie	17
2.5 Mikroskopische Auswertung	18
2.6 Lösungen und Reagenzien	19
3. Ergebnisse	21
3.1 Superior Cervical Ganglion (SCG)	21
3.1.1 Hämoxygenase-2	21
3.1.2 Tyrosinhydroxylase	26
3.1.3 Hämoxygenase-1	27
3.2 Stellate Ganglion (SG)	29
3.2.1 Hämoxygenase-2	29
3.2.2 Tyrosinhydroxylase	34
3.2.3 Hämoxygenase-1	34
3.3 Celiac Superior Mesenteric Ganglion (CSMG)	36
3.3.1 Hämoxygenase-2	36
3.3.2 Tyrosinhydroxylase	41
3.3.3 Hämoxygenase-1	41

3.4	Inferior Mesenteric Ganglion (IMG)	43
3.4.1	Hämoxigenase-2	43
3.4.2	Tyrosinhydroxylase	47
3.4.3	Hämoxigenase-1	48
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	50
3.6	Dorsal Root Ganglion (DRG)	51
4.	Diskussion	53
4.1	HO-2 während der embryonalen Entwicklung sympathischer Ganglien	53
4.2	Lokalisation von HO-2 in sympathischen Ganglien	54
4.3	Vergleich sympathischer versus sensorischer Ganglien	55
4.4	Bedeutung der HO-2 während der Embryogenese	56
4.5	HO-1 in sympathischen Ganglien	59
5.	Zusammenfassung	60
6.	Summary	62
7.	Literatur	64
8.	Lebenslauf	78
9.	Danksagung	79

1. Einleitung

Hämoxigenasen (HO) leiten den enzymatischen Abbau von Häm zu den Gallenpigmenten ein. Als Maines und Kappas [1975] Hämoxigenasen erstmals beschrieben, wurde die von der Hämoxigenase katalysierte Reaktion von Häm zu Biliverdin unter Freisetzung von Kohlenmonoxid (CO) und Eisen (Fe^{2+} -Ionen) rein als Abbauprozess verstanden. Die Erkenntnis, dass die entstehenden (Neben-)Produkte CO und Biliverdin bzw. Bilirubin physiologisch wirksam sein können, führte zu einem gesteigerten Interesse an Hämoxigenasen. Die Identifizierung von Stickstoffmonoxid (NO) als Prototyp einer neu entdeckten Klasse gasförmiger Transmitter führte zur Annahme, dass CO womöglich ein weiterer gasförmiger Mediator sein könnte [Marilena et al., 1997]. Zuvor wurde dem Hämabbau im Nervensystem lediglich im Rahmen von Bilirubinenzephalopathien von Neugeborenen Beachtung geschenkt, wo eine Hemmung der HO als therapeutische Möglichkeit angenommen wurde [Valaes et al., 1994].

Aus dem Endprodukt der HO-Reaktion, Biliverdin, entsteht Bilirubin, dem eine Bedeutung als physiologisch wirksamen Antioxidans zugesprochen wird [Stocker et al., 1987; Neuzil et al., 1993]. HO könnte neben seiner rein metabolischen Aufgabe, der Hämdegradation, sowohl durch die Mediatorfunktion des CO als auch durch das antioxidativ wirksame Bilirubin unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen im Nervensystem eine Rolle spielen. Der Nachweis von HO-Aktivität im Klein- und Stirnhirn von Meerschweinchen während der Embryonalentwicklung nährte die Vermutung, HO-generiertes CO spiele sogar in der neuronalen Entwicklung eine Rolle [Cook et al., 1997]. Weiterführende Untersuchungen über Hämoxigenasen im peripheren Nervensystem während der embryonalen Entwicklung stehen jedoch noch aus.

1.1 Hämmetabolismus

Häm, Ferro-(Fe^{2+})-protoporphyrin IX, ist das bekannteste der Metalloporphyrine, die aus einem Porphyrinring und einem katalytisch aktiven Metallion bestehen und die Fähigkeit besitzen, Sauerstoff zu binden und zu transportieren. An Proteinen gebunden, dienen Hämproteine dem Sauerstofftransport (Hämoglobin, Myoglobin), dem Elektronentransport (Cytochrome a, b, c) und der Sauerstoffaktivierung (Cytochrom P_{450}). Der größte Teil des im Körper vorkommenden Häms ist im Hämoglobin in den Erythrozyten gebunden. Ca. 80% des täglich abgebauten Häms stammen aus dem Hämoglobinabbau. Freies, ungebundenes Häm selbst besitzt oxidatives/toxisches Potential, welches die Enzymexpression von HO-1 stimuliert [Lincoln et al., 1988; Gabis et al., 1996].

HO leiten als Schrittmachereozym den Abbau von Häm durch Spaltung der α -Methinbindung des Porphyrinringes ein. Unter Freisetzung von Fe^{2+} -Ionen und unter Elimination von CO entsteht Biliverdin. In einem weiteren Schritt wird mittels der Biliverdin-Reduktase (BVR) Bilirubin gebildet. Abbildung 1 schildert den Abbau von Häm zu Biliverdin durch Hämoxigenasen [Schüller et al., 1999].

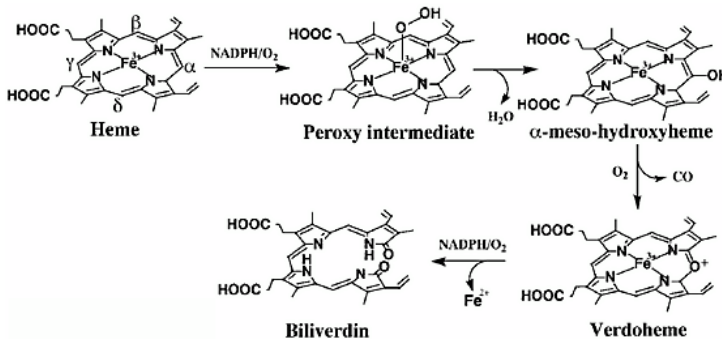


Abb. 1: Schema des Hämabbaus [Schüller et al., 1999].

1.2 Hämoxigenasen: Biochemie, Struktur und Funktion

HO wurde von Maines et al. [1975] als ein mikrosomales, Cytochrom P-450 unabhängiges Enzymsystem beschrieben. Mittlerweile wurden drei Isoformen der HO identifiziert, welche jeweils von einem Gen codiert werden. HO-1 ist ein Stressprotein, welches auch als Hitzeschockprotein 32 (HSP32) bezeichnet wird [Shibahara et al., 1987; Gabis et al., 1996]. Das Protein besteht aus 288 Aminosäuren beim Menschen und aus 289 bei der Ratte. Zu 90% sind beide Formen identisch. HO-1 kommt ubiquitär, vor allem aber in Leber, Milz und Nieren vor [Rotenberg et al., 1991; Trakshel et al., 1986; Maines et al., 1986; Ewing et al., 1993; Elbirt et al., 1998]. Die HO-1 Expression wird durch eine Vielzahl von Stimuli induziert und von Inhibitoren blockiert, welche in der Tabelle 1 zusammengefasst sind.

HO-2 kommt konstitutiv vor und weist eine komplexe Genstruktur auf. Es existieren zwei unterschiedlichen mRNAs: HO-2a und HO-2b. Die HO-2a mRNA wird überwiegend in den Testes und HO-2b mRNA in allen anderen Geweben exprimiert [Gibbs et al., 1998]. Das Protein besteht aus 316 Aminosäuren beim Menschen und 315 bei der Ratte. Auch hier beträgt die Übereinstimmung zwischen den Spezies ca. 90%. HO-2 kommt überwiegend im Gehirn und in den Testes vor. [Rotenberg et al., 1991; Trakshel et al., 1986; Maines et

al., 1986; Ewing et al., 1993; Elbirt et al., 1998]. Glucocorticoide konnten bislang als einzige stimulierende Faktoren zur Enzymexpression identifiziert werden. In Gehirnen neugeborener Ratten kam es nach Behandlung mit Glucocorticoiden zur verstärkten HO-2 Expression [Maines et al., 1996; Raju et al., 1997; Ewing et al., 1997]. Im Rattenhoden konnten diese Effekte ebenso nachgewiesen werden [Liu et al., 2000].

HO-3 kommt ubiquitär, vor allem aber in Leber, Prostata und Nieren vor. HO-3 und HO-2 weisen eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von etwa 90% auf. HO-3 weist weniger eine Häm-katalysierende Kapazität als eine hämsensitive oder hämbindende Funktion auf. [McCoubrey et al., 1997]. In der Tabelle 1 sind Vorkommen, Funktionen, Stimuli und Inhibitoren der Enzymexpression zusammengestellt.

	HO-1	HO-2	HO-3
Vorkommen	ubiquitär insbes. Leber, Milz, Niere	Gehirn, Testes periphere Neurone	ubiquitär, insbes. Leber, Niere, Gehirn
Molekulargewicht	≈32-33 kD	≈36 kD	≈32-33 kD
mRNA-Isoformen	1 (3)	2	1
Transkriptgröße	≈1,8 kb	1,3≈1,9 kb	≈2,4 kb
Enzymaktivität	induzierbar	konstitutiv	konstitutiv
Stimuli der Enzymexpression	Häm (1) Metallionen, -porphyrine (2) Zytokine (3) Prostaglandine (4) UV-Licht (5) Cobalddchlorid (6) Wasserstoffsuperoxid (5) Lipopolysaccharide (7)	Glucocorticoide (8)	nicht bekannt
Inhibitoren der Enzymaktivität	Zink-Protoporphphyrin IX (9) Chrom-Mesoporphyrin (10) Cobalt-Protoporphyrin (10) Zinn-Protoporphyrin-IX (11)	Zink-Protoporphphyrin IX (9) Chrom-Mesoporphyrin (10) Cobalt-Protoporphyrin (10) Zinn-Protoporphyrin-IX (11)	nicht bekannt

Tabelle 1: Synopse über Lokalisation, Funktionen, Stimuli der Enzymexpression und Inhibitoren der Enzymaktivität der Hämoxigenasen-Isoformen, nach Elbirt et al. [1999].

- | | |
|--|--|
| (1) Lincoln et al., 1988; Gabis et al., 1996 | (2) Llesuy et al., 1994; Maines et al., 1977 |
| (3) Fukuda et al., 1993 | (4) Rossi et al., 1995 |
| (5) Keyse et al., 1989 | (6) Thorup et al., 1999 |
| (7) Camhi et al., 1995 | (8) Maines et al., 1996; Raju et al., 1997 |
| (9) Prabhakar et al., 1995 | (10) Kozma et al., 1999 |
| (11) Zakhary et al., 1996 | |

1.3 Kohlenmonoxid – ein intrazellulärer Mediator

Ebenso wie NO aktiviert das beim Hämabbau freigesetzte CO die lösliche Guanylatzyklase (sGC), wobei NO eine 100-fach größere Affinität zur sGC besitzt als CO [Friebe et al., 1996]. Dadurch kommt es zum Anstieg des zyklischen Guanosin-3',5'-monophosphats (cGMP). CO kann sowohl die sGC derselben Zelle aktivieren und somit sowohl als intrazellulärer Mediator dienen, als auch im geringen Umfang Nachbarzellen als interzellulärer Mediator beeinflussen [Knowles et al., 1989; Ingi et al., 1996]. Die Proteine HO-2 und HO-3 weisen in ihrer Primärstruktur ein seltenes Motif auf, welches als das Häm regulierende Motif angesehen wird [Zhang et al., 1995]. Einerseits inhibiert NO signifikant die HO-2 Aktivität, andererseits moduliert HO-2 über seinen Hämliganden die NO-Konzentrationen. Ding et al. [1999] sprachen von einer Abfallerimerfunktion der HO-2 und HO-3. Auf diese Weise werden die Konzentrationen der Signalmoleküle CO und NO reguliert. Maines [1997, 2000] geht sogar soweit, bei HO-2 und auch HO-3 von einem zellulären Sauerstoffsensoren zu sprechen.

Thorup et al. [1999] konnten an Widerstandsgefäßen der Rattenniere und Zakhary et al. [1996] an Pulmonalarterien des Schweines zeigen, dass CO dosisabhängig über die Aktivierung der sGC vasodilatatorisch wirkt. Verglichen mit NO ist CO jedoch ein schwacher Vasodilatator. In höheren Konzentrationen geht der NO-CO-Synergismus verloren, und CO wirkt durch direkte Hemmung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) vasokonstriktorisch [Thorup et al., 1999]. Kozma et al. [1999] stellten fest, dass Widerstandsgefäße unter einem tonischen vasorelaxierenden Mechanismus des endogenen CO stehen. Zou et al. [2000] berichteten, dass das HO/CO-System zur Aufrechterhaltung des Blutflusses in der Rattennebeniere beiträgt. Grozdanovic et al. [1996] und Cardell et al. [1998] fanden heraus, dass CO vor allem unter Hypoxie eine Bronchodilatation auszulösen vermag.

1.4 Bilirubin – ein wirksames Antioxidans

Als stabiles Zwischenprodukt aus dem Hämabbau entsteht Biliverdin, welches mittels der BVR zu Bilirubin reduziert wird. Freies und an Albumin gebundenes Bilirubin wirken antioxidativ. Bilirubin wird durch Einfangen von Hydroperoxidradikalen wieder zu Biliverdin oxidiert und rasch wieder über BVR zu Bilirubin reduziert. Bilirubin besitzt etwa 1/10 der antioxidativen Wirkung des Ascorbats [Neuzil et al., 1993]. Aufgrund seiner Lipophilie stellt Bilirubin ein wichtiges Antioxidans für Lipoproteine und Membrane dar. Es besitzt daher eine vergleichbare Wirkung mit dem Vitamin E [Farrera et al., 1994]. Dennerly et al. [1995] fanden heraus, dass das Ausmaß Hyperoxie-induzierter Lungenödeme neugeborener Gunn-Ratten, die erhöhte Serumbilirubinwerte im Vergleich zu einem Wildtyp aufwiesen, signifikant geringer ausfiel. Die transiente Hyperbilirubinämie nach Geburt wurde als Schutz vor oxidativem Stress aufgefasst. Die antioxidative Wirkung wurde auch in anderen Organsystemen beschrieben: in der Haut nach UV-Bestrahlung [Applegate et al., 1995], Schutz vor Atherosklerose [Wang et al., 1998] und Schutz vor nephrotoxischen Nierenversagens [Mosley et al., 1998]. Magnusson et al. [2000] entdeckten in Neuronen peripherer sensibler Ganglien zunächst eine geringe BVR-Aktivität, die sich in Zellkultur deutlich steigern ließ. Nach Axotomie wurde vermehrt HO-1 induziert und NOS gebildet. CO und NO wurden daher neuroregenerative und Bilirubin neuroprotektive Effekte zugeschrieben [Magnusson et al., 2000].

1.5 Hämoxygenasen im Nervensystem

1.5.1 Hämoxygenasen im Zentralnervensystem

Hämoxygenasen wurden erstmals in Rattengehirnen nachgewiesen [Maines et al.; 1986]. Zunächst wurde angenommen, dass die konstitutive Expression von HO-2 im Gehirn für die Homöostase von Bedeutung ist, während die induzierbare HO-1 zur Anpassung an wechselnde Umgebungsbedingungen dient [Maines MD, 1988]. Mit der Entdeckung, dass CO ein neuronaler Mediator sein könnte [Maines et al., 1986], wurde das Interesse an Hämoxygenasen und deren Wirkung im Nervengewebe entfacht.

Unter anderem wurde die zytoprotektive Wirkung von HO-1 und HO-2 am ZNS untersucht. Eine intrazerebrale Injektion von Lipopolysacchariden oder Interferon- γ löste in den Gehirnzellen eine HO-1 Induktion aus [Matsuoka et al., 1998]. Unter Hyperthermie oder Hypoxie konnte ein Anstieg der HO-1-mRNA auf das 30-50fache beobachtet werden [Ewing et al., 1992]. Chen et al. [2000] fanden heraus, dass HO-1 neuroprotektiv wirkt. Membranschäden, die durch neurotoxischen Glutamats und H_2O_2 hervorgerufen wurden, fielen in transgenen Mäusen, die HO-1 überexprimierten, signifikant geringer aus als bei nontrans-

genen Mäusen. Panahian et al. [1999] stellten fest, dass nach Okklusion der A. cerebri media in transgenen Mäusen, die HO-1 überexprimierten, signifikant kleinere Infarkt volumina auftraten als in nontransgenen Mäusen. Einer HO-1-Überexpression wurde generell neuroprotektive Wirkung gegen "stressinduzierende" Oxidationsmittel zugesprochen [Le et al., 1999].

Neuroprotektive Wirkung konnte auch für HO-2 nachgewiesen werden. Nach Okklusion der A. cerebri media wurden signifikant größere Infarktvolumina bei HO-2^{-/-} Mäusen festgestellt als beim korrespondierenden Wildtyp. HO-2 zusammen mit dem antioxidativen Biliverdin schützte im Wesentlichen vor Apoptose und weniger vor Nekrosenbildung. Der Vergleich zwischen HO-1^{-/-} mit HO-2^{-/-} Mäusen ergab außerdem wesentlichen Unterschiede. Während die HO-1^{-/-} Mäuse debil wirkten, entwickelten sich HO-2^{-/-} Mäuse mit Ausnahme von Ejakulationsstörungen normal [Dore et al., 2000].

Die protektive Wirkung der Hämoxigenasen konnte auch an anderen Organsystemen festgestellt werden: Eine HO-1-Überexpression schützt das Bronchialsystem vor oxidativem Stress [Dennerly et al. 1998], vor kongestiver Rechtsherzinsuffizienz [Raju et al., 1999], vor Rechtsherzinfarkten [Yet et al., 2001; Katori et al., 2002] und bietet eine Langzeitprotektion vor koronarer Herzerkrankung [Melo et al., 2002].

1.5.2 Hämoxigenasen im peripheren Nervensystem

Nachdem Hämoxigenasen im Zentralnervensystem nachgewiesen worden waren, wurde deren Vorkommen auch im peripheren Nervensystem untersucht. HO-2 wurde in den Neuronen der paravertebralen sympathischen Ganglien - Ganglion cervicale superius (superior cervical ganglion: SCG) und Ganglion stellatum (stellate ganglion: SG) - und prävertebralen sympathischen Ganglien - Ganglion coeliaco-mesentericum-superius (cealic superior mesenteric ganglion: CSMG) und Ganglion mesentericum inferius (inferior mesenteric ganglion: IMG) – des Meerschweinchens nachgewiesen [Vollerthun et al., 1995]. Außerdem wurde HO-2 in einigen Dendriten, nicht aber in Axonen und deren terminalen Endigungen nachgewiesen.

HO-2 konnte auch in den Neuronen der sensorischen Spinalganglien (dorsal root ganglion: DRG) sowie in den Ganglien trigeminale, jugulare und nodosum des Meerschweinchens nachgewiesen werden. In intraganglionären non-neuronalen Zellen wie Satellitenzellen, Schwannzellen, Fibroblasten und Endothelien der Gefäße konnte HO-2 dagegen nicht nachgewiesen werden [Vollerthun et al., 1996].

Sowohl in den sensorischen Ganglien als auch im sympathischen SCG der Ratte konnte HO-1 mit schwacher Immunreaktion nachgewiesen werden. Nach Axotomie wurde jedoch

eine intensive HO-1 Induktion sowohl in den Axonen als auch in den Perikarien registriert. Magnusson et al. [2000] schlossen daraus, dass unter Stressbedingungen die Kapazität von HO-2, Häm zu degradieren, nicht ausreicht und eine HO-1 Induktion zur neuronalen Regeneration daher notwendig ist.

Hinsichtlich des Vorkommens von HO-1 existieren widersprüchliche Angaben. Während HO-2 in 25-30% der Perikarien des Gl. petrosus, in 70% des SCG und in 75% der enteralen Ganglienzellen der Ratte nachgewiesen werden konnte, wurde HO-1 dagegen nicht nachgewiesen [Zakhary et al. 1996]. Ferner wurde HO-2 in den Glomuszellen des Glomus caroticum der Katze und der Ratte [Prabhakar et al., 1993, 1999; Overholt et al., 1996], sowie in Perikarien intrinsischer Ganglien der Trachea und Bronchien des Menschen und des Meerschweinchens nachgewiesen [Canning et al., 1998].

In den Ganglia pelvica und in den zum Penis führenden Nervenfasern der Maus konnte HO-2 ebenso nachgewiesen werden [Burnett et al., 1998]. HO-2 und neuronale NO-Synthase (nNOS) waren in 20% der Perikarien kolokalisiert [Grozdanovic et al., 1999]. Hedlund et al. [2000] schlossen daraus, dass endothelial freigesetztes NO und das HO/CO-System bei der penilen Erektion synergistische Effekte zu haben scheinen.

Das Vorkommen der Hämoxigenasen wurde außerdem im enterischen Nervensystem untersucht. HO-2 konnte in enterischen Neuronen der Katze, des Hundes [Ny et al., 1995, 1996, 1997] und der Ratte [Grozdanovic et al., 1996; Donat et al., 1999] nachgewiesen werden. Werkström et al. [1997] fanden heraus, dass HO-2 generiertes CO für die Relaxation des unteren Oesophagus sphinkters des Schweines verantwortlich ist. HO-2 wurde in den Ganglienzellen des Plexus myentericus und submucosus sowie in einigen Nervenfasern nachgewiesen [Werkström et al., 1997]. Miller et al. [2001] wiesen HO-2 in enterischen Ganglienzellen und in einigen Nervenfasern zwischen den longitudinalen und zirkulären glatten Muskelschichten des humanen Antrums und des Jejunums nach. In 40% der Perikarien des Plexus myentericus und in 10% des Plexus submucosus waren HO-2 und NOS kolokalisiert. HO-1 konnte nicht nachgewiesen werden.

HO-2 wurde in den interstitiellen Zellen (ICC, interstitial cells of Cajal) des murinen Dünndarmes nachgewiesen, die für die gastrointestinale Motilität verantwortlich sind. CO wurde als Neurotransmitter dieser Schrittmacherzellen diskutiert [Miller et al., 1998; Farrugia et al., 1998].

In 98% der Ganglienzellen des Plexus myentericus und in 96% der Ganglienzellen des Plexus submucosus der inneren Analregion des Opossums waren HO-2 und nNOS kolokalisiert. Die Kolokalisation nahm aboralwärts auf 56% ab. Battish et al. [2000] spekulierten, ob NO und CO interagierende Mediatoren der Relaxation des inneren Analsphinkters sein könnten.

1.5.3 Hämoxigenasen während der embryonalen Entwicklung

Obwohl Vorkommen, Verteilung und Wirkungen der Hämoxigenasen im zentralen, peripheren und enterischem Nervensystem adulter Tiere ausführlich untersucht wurden, berichteten Autoren über Hämoxigenasen während der Embryonalentwicklung außerordentlich wenig.

HO-1 konnte bereits sehr früh (Embryonaltag 6.5=E6.5) im Ektoplazentarkonus und in den Trophoblastenzellen (E10.5) der Maus nachgewiesen werden [Watanabe et al., 2004]. Aus den Zellen des Ektoplazentarkonus entsteht die Plazenta, deren Entwicklung bis zum E14.5 vollständig abgeschlossen ist. Zu diesem Zeitpunkt wurde die höchste Expression von HO-1 mRNA registriert, die etwa 90% dem Level einer adulten Mäusemilz entsprach. Danach nahm die HO-1 mRNA Expression um 50% am folgenden Tag (E15.5) rasch wieder ab. Bis zur Geburt änderte sich der Level nicht mehr. HO-2 mRNA wurde in der Plazenta auf einem konstant niedrigen Level nachgewiesen. Der Proteinlevel in der Plazenta entsprach 10% des Proteinlevels der Hoden [Watanabe et al., 2004].

Dennery et al. [2003] wiesen die Expression von HO-1- und HO-2-mRNA in Lungen von Rattenembryos (E16.5) nach. Während die höchste HO-1-mRNA Expression zwischen E19.5-E20.5 nachgewiesen wurde, wurde HO-2 konstant exprimiert. Der höchste HO-1-Proteinlevel wurde unmittelbar postnatal, der höchste HO-2-Proteinlevel 5 Tage nach der Geburt festgestellt. Die höchste HO-Aktivität wurde unmittelbar vor der Geburt registriert.

HO-1 konnte in Dottersackzellen der Ratte (E10) nachgewiesen werden. Mit Beginn der hepatischen Hämatopoese (E13) wurde HO-1 mRNA in der Leber nachgewiesen. Unmittelbar vor der Geburt (E20) wurde HO-1 in der Milz und unmittelbar nach der Geburt im Dünndarm nachgewiesen [Watanabe et al., 2003].

Im zentralen Nervensystem konnte HO-1 im Kleinhirn des Meerschweinchens (E62) nachgewiesen werden [Cook et al., 1997]. Jedoch scheint die Entwicklung von HO-1 im Wesentlichen postnatal statt zu finden. In Rattengehirnen wurde am 7. Tag nach der Geburt die stärkste HO-1 Proteinexpression beobachtet [Bergeron et al., 1998].

Ähnliches wurde auch für HO-2 beobachtet. Sun et al. [1990] fanden heraus, dass die HO-2 Proteinexpression in Rattengehirnen einen Tag vor Geburt bis zum adulten Stadium um das 2fache ansteigt.

1.6 Fragestellung und Ziel

Mit der Entdeckung von NO als Prototyp einer neu entdeckten Klasse gasförmiger Transmitter wurde die Möglichkeit diskutiert, ob HO generiertes CO, das im Nervensystem durch den Abbau von Häm reichlich anfällt, ebenso wie NO ein weiterer gasförmiger Transmitter

sein könnte, oder ob CO lediglich ein Abbauprodukt darstellt. Hierzu wurden Vorkommen und Wirkungsmechanismen von HO-2 und HO-1 sowohl im zentralen als auch im peripheren und im enterischen Nervensystem adulter Tiere untersucht. Sehr wenige Autoren haben Hämoxigenasen im zentralen Nervensystem während der embryonalen Entwicklung untersucht. Im peripheren Nervensystem existieren bislang keine Untersuchungen über das Vorkommen und der Verteilung von Hämoxigenasen während der embryonalen Entwicklung. Daher sollen HO-2 und HO-1 an den paravertebralen sympathischen Ganglien SCG und SG, an den prävertebralen sympathischen Ganglien CSMG und IMG untersucht werden. Ziel ist es, den Beginn der Proteinbiosynthese der HO-Isoformen während der murinen Embryonalentwicklung zu ermitteln. Mögliche zeitliche Entwicklungsunterschiede hinsichtlich der Entwicklung der Proteinbiosynthese der HO-Isoformen zwischen den paravertebralen und prävertebralen Ganglien sollen erfasst werden. Hierzu sollen ergänzende Untersuchungen auch an den sensorischen DRG vorgenommen werden. Die Beantwortung dieser Fragen hat als Ziel, strukturelle Grundlagen zur Klärung der Bedeutung von Hämoxigenasen während der Embryonalentwicklung zu legen.

2. Material und Methode

2.1 Mäusehaltung und -züchtung

Zur Zucht wurden braune Hausmäuse (*Mus musculus musculus*) verwandt. Alttiere wurden in Standardkäfigen im Verhältnis Weibchen:Männchen = 2:1 gehalten. Jungtiere wurden in Großraumkäfigen geschlechtlich getrennt gehalten. Die Tiere wurden mit der Standarddiät für Mäusezucht und mit ausreichend Trinkwasser bei einem Lichtrhythmus von 12 Stunden hell und 12 Stunden dunkel gehalten.

Nach einer Tragezeit von 20-21 Tagen wurden durchschnittlich 10-11 Junge (6-14) geworfen. Nach 4-6 Wochen wurde die Geschlechtsreife erreicht. Jungtiere wurden von den Alttieren getrennt, um eine unkontrollierte Paarung zu verhindern. Durch die geschlechtsspezifische räumliche Trennung wurden Jungtiere herangezogen, bei denen die Ovulation ausblieb.

Zum Züchten von Embryonen wurden Tiere im Alter von mindestens 7-8 Wochen verwandt. 4 Tage vor der geplanten Kopulation wurde ein Großraumkäfig mit 40 weiblichen Tieren direkt neben einem Großraumkäfig mit Böcken für 3 Nächte plziert. Durch die mit dem Urin der Böcke ausgeschiedenen Duftstoffe konnte bei einigen Tieren ein Eisprung ausgelöst werden. Am 4. Tag wurden um 22.00 Uhr Weibchen und Böcke in einem Verhältnis von 4:1 maximal 5:1 in Kleinkäfigen zusammengesetzt. Die Begattung erfolgte in der Regel um oder wenige Stunden nach Mitternacht. Nach 12 Stunden Paarungszeit wurden die Tiere um 10.00 Uhr des folgenden Tages wieder voneinander getrennt. Falls eine Maus begattet worden war, begann jetzt der erste Tag der Trächtigkeit (E0.5) [Kaufmann et al., 1999].

2.2 Gewebebearbeitung

Die trüchtige Maus eines gewünschten Stadiums wurde mit Hilfe einer großen Pinzette durch einen Genickbruch getötet und mit Präparationsnadeln auf einer Unterlage fixiert. Der Situs wurde mit dem stumpfen Schenkel einer Präparationsschere vorsichtig eröffnet und der Uterus mit einem mit Phosphatpuffer (siehe 2.6) getränkten Tupfer vor Austrocknung geschützt. Mit einer feinen Pinzette und einer feinen Präparationsschere wurde der Uterus eröffnet und die Eihäute entfernt.

Die Embryonen wurden in einem mit Chloroform (Fa. Merck KG, Darmstadt) gefüllten Exsikkator getötet und in ein Gefäß mit Phosphatpuffer gegeben. Embryonen ab E16.5 wurde mit feinen Präpariernadeln auf einer Unterlage fixiert, und das Herz mit einer feinen

Pinzette und mit einer feinen Präparierschere freigelegt. Mit einer Insulinkanüle wurde der linke Ventrikel punktiert, 10 ml Vorspüllösung [Forssmann et al., 1977] und 10 ml Zambonifixans [Stefanini et al., 1967] perfundiert (siehe jeweils 2.6). Anschließend wurden die perfundierten Embryonen über Nacht bei 4°C zusätzlich mit Zambonifixans immersionsfixiert. Jüngere Stadien (E14.5, E15.5) brauchten nur immersionsfixiert werden.

Nach dem Fixieren wurden die Embryonen über Nacht und auch am folgenden Tag mehrfach in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen, bis die gelbe Farbe des Zambonifixans vollständig ausgewaschen worden war. Am folgenden Tag wurden die Proben zur Kryoprotektion in 18 % saccharosehaltigen 0,1 M Phosphatpuffer (siehe 2.6) überführt. Mehrmals gewechselt, verblieben die Embryonen einen Tag in dieser Lösung. Anschließend wurden sie in Tissue Tek[®] (Tissue Tek[®] O.C.T. Compound, Sakura Fintek Europa B.V. Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet, mit flüssigem Stickstoff in kraniokaudaler Ausrichtung - zur Herstellung axialer Schnitte - eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.3 Anfertigen von Gewebeschnitten

Die in Tissue Tek[®] eingefrorenen Embryonen wurden in vertikaler Ausrichtung auf einen Objekthalter aufgefroren und in kraniokaudaler Richtung bei -28°C im Kryostaten (Jung Frigocut 2800 E, Fa. Leica, Bensheim, BRD) in Serie geschnitten.

Der Kopf wurde bis zum Dens axis unter laufender Kontrolle der Schnittlage im Embryo – mit einer 0,25% Toluidinblau O (Chroma-Gesellschaft, Schmidt&Co, Stuttgart/Untertürkheim) in 0,1 M PBS Lösung (Kryoschnellfärbung, siehe 2.6) - in 200 µm Schritten abgetragen. Nachdem das SCG angeschnitten worden war, wurde eine axiale Schnittserie mit einer Schnittdicke von 10 µm angefertigt und auf chromgelatinierte Objektträger (siehe 2.6) aufgezogen. Die angefertigten Serienschnitte wurden 3 Stunden luftgetrocknet und bei -20°C gelagert.

Danach wurden die restlichen Halsabschnitte unter laufender Kontrolle der Schnittlage bis zum Aortenbogen vorsichtig abgetragen. Nach Anschnitt des SG wurde eine Schnittserie wie oben beschrieben entnommen. Außerdem wurden Schnittserien thorakaler DRG angefertigt. Unter laufender Kontrolle bis zum Anschnitt des CSMG wurden Thorax und Oberbauch in 40 µm Schritten abgetragen und eine Schnittserie aus dem Ganglion angefertigt. Außerdem wurden Schnittserien lumbaler DRG angefertigt. Bis zum Anschnitt des IMG wurde der restliche Oberbauch bis zum kaudalen Ende der Nieren abgetragen und eine Schnittserie wie oben beschrieben angefertigt.

2.4 Immunhistochemie

Eine Schnittserie umfasste 4 Objektträger mit jeweils 3 Schnitten aus dem jeweiligen Ganglion. Objektträger Nr. 1 wurde mit Kryoschnellfärbung zur Ermittlung der Anzahl der Ganglienzellen eingefärbt.

Nr. 2 wurde zum Nachweis eines sympathischen Ganglions mit anti-TH inkubiert. TH ist das Schrittmacherenzym der Katecholaminbiosynthese [Levitt et al., 1965]. Für folgende sympathischen Ganglien der adulten Maus konnte TH nachgewiesen werden: SCG [Gibbins, 1991], SG [Story et al., 2000] und CSMG [Jobling et al., 1999]. Während der embryonalen Entwicklung konnte TH im SCG (E13.5) [Coughlin et al., 1977], sowie im SG und CSMG nachgewiesen werden [Glebova et al., 2004].

Objektträger Nr. 3 wurde mit anti-HO-2 bzw. anti-HO-1 und Nr. 4 für die Kontrollreaktion ohne Primärantikörper inkubiert. Die Spezifität der immunhistochemischen Reaktion des HO-2 Antiserums wurde mittels Präabsorptionsversuche mit rekombiniertem HO-2 Protein nachgewiesen [Vollerthun et al., 1995]. Die verwendeten Antiseren sind in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt. Die aliquotierten Antikörper wurden bei -80°C aufbewahrt. Zum Gebrauch wurden sie nach dem Auftauen in Natriumazid-haltigem PBS mit doppeltem Salzgehalt verdünnt und bei 4°C gelagert. Das Natriumazid (Fa. Merck KG, Darmstadt) verhinderte die Kontamination mit Mikroorganismen.

Die Objektträger Nr. 1 wurden 3 Minuten mit Kryoschnellfärbung eingefärbt, 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen und zur Erhöhung der Lichtdurchlässigkeit in carbonatgepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckelt (siehe 2.6).

Die Objektträger Nr. 2, 3 und 4 wurden nach dem Prinzip der Einfachimmunfluoreszenz behandelt. Die Gewebeschnitte wurden zunächst 2 x 5 und zusätzlich für 2 x 10 Minuten in PBS gewaschen, um das restliche Zambonifixans vollständig aus dem Gewebe zu lösen, und für eine Stunde mit einer Lösung zum Blocken von unspezifischen Proteinbindungsstellen inkubiert. Diese Blocklösung enthielt 10% normales Schweineserum, 0,1% Rinderserumalbumin (jeweils aus dem Schlachthof Giessen stammend) und 0,5% Tween 20 (Fa. Sigma, St. Louis, MO, USA) in PBS (siehe 2.6). Nach weiteren 2 x 10 Minuten Waschen in PBS wurden die Gewebeschnitte über Nacht mit den Primärantikörpern (siehe Tabelle 2) in einer feuchten Kammer inkubiert. Objektträger Nr.4 für die Kontrollreaktion wurde ohne den Primärantikörper inkubiert. Die Primärantikörper wurden mit Blocklösung verdünnt, um Hintergrundreaktionen zu vermindern. Am folgenden Tag wurden die Objektträger 2 x 10 Minuten in PBS gewaschen und für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3) inkubiert, der in PBS mit doppelter Salzkonzentration verdünnt worden war. Der erhöhte Salzgehalt diente zur Verringerung von Hintergrundreaktionen [Grube et al., 1980]. Der Sekundärantikörper stammte von einer anderen Tierspezies als der Primäranti-

körper und war gegen das im Primärserum enthaltene Immunglobulin gerichtet. Anschließend wurden die Gewebeschnitte erneut für 2 x 10 Minuten in PBS gewaschen und in carbonatgepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckelt.

Antigen	Wirt	Verdünnung	Quelle
Tyrosine Hydroxylase	Kaninchen	1:400-800	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
HO-1	Kaninchen	1:1600	AFFINITI Research Products Ltd, Mamhead Exeter, UK
HO-2	Kaninchen	1:1600	StressGen Biotechnologies Corp. Victoria, BC, Canada

Tabelle 2: Liste der verwendeten Primärantikörper.

Antigen	Konjugat	Wirtspezies	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-IgG	Fluorescein- Isothiocyanat (FITC)	Ziege	1:400	Organon Teknika Corporation, Eppelheim

Tabelle 3: Verwendeter Sekundärantikörper.

2.5 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Modell BX60F, Hamburg). Die geeignete Filterkombination ist in Tabelle 4 dargestellt:

Filterkombination	Fluorochrom	Erregerfilter	Sperrfilter
U-MNIB	FITC	band pass 470-490 nm	band pass 515-550 nm

Tabelle 4: Verwendete Filterkombination

Zur Dokumentation wurden Schwarz-Weiß-Fotos (Kodak TMY 400) mit einem am Fluoreszenzmikroskop angeschlossenen Fotomikrografik-System (40-fachen Objektivvergrößerung) angefertigt und mit einer angeschlossenen digitalen Kamera zur Auswertung Bilddateien erstellt. Die Bilddateien wurden mit dem Programm Scion Image Scion Corporation, Maryland, USA) bearbeitet.

Pro Ganglion eines Entwicklungsstadiums wurden von 3 unterschiedlichen Tieren jeweils 6-9 Querschnitte als pars pro toto ausgewertet. Es wurden sowohl die mit Kryoschnellfärbung (Durchlichtbild) angefärbten Ganglienzellen als auch der Folgeschnitt (Abstand 20 µm) mit den HO-2 positiven Ganglienzellen (Fluoreszenzbild) per Mausclick markiert und durch ein Macro (geschrieben von Andre Kavran, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus Liebig Universität Giessen) ausgezählt. Die Anzahl HO-2 positiver Ganglienzellen wurde im Vergleich zu der Anzahl aller Ganglienzellen (Kryoschnellfärbung) berechnet.

2.6 Lösungen und Reagenzien

Vorspüllösung [Forssmann et al., 1977]:

- PVP (Polyvinylpyrrolidon, MG 40000) 25 g
- NaCl reinst 9 g
- Procainhydrochlorid reinst 5 g
- Aqua dest. 1000 ml

Die Reagenzien wurden miteinander vermischt und die Lösung auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit Membranen der Porengröße 0,6-3,0 µm gefiltert. Unmittelbar vor der Perfusion wurden 2 ml Heparin (Liquemin 25000 ad 5 ml Ampullen, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) dazugegeben.

Phosphatpuffer 0,2 M:

- Lösung A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat) 27,6 g/l = 0,2 M
 - Lösung B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat) 35,6 g/l = 0,2 M
- 230 ml der Lösung A wurden mit 770 ml der Lösung B gemischt und die Lösungen auf pH 7,4 eingestellt. Beide Reagenzien stammten von der Firma Merck KG, Darmstadt.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):

- Lösung A 8,75 ml
- Lösung B 6,20 ml
- NaCl 22,4 g, doppelt NaCl 44,8 g [Grube et al., 1980]
- Aqua dest. 5000 ml

Die einzelnen Reagenzien wurden miteinander vermischt und die Lösungen auf pH 7,4 eingestellt. Alle Reagenzien stammten von der Firma Merck KG, Darmstadt.

Zambonifixans [Stefanini et al., 1967]:

- 37%ige Formaldehydlösung 50 ml
0,2 M Phosphatpuffer 500 ml
gesättigte Pikrinsäure 150 ml
Aqua dest. 300 ml

Die einzelnen Reagenzien wurden miteinander vermischt und die Lösungen auf pH 7,4 eingestellt. Alle Reagenzien stammten von der Firma Merck KG, Darmstadt.

18%ige Saccharoselösung:

- 0,2 M Phosphatpuffer 500 ml
Saccharose 180 g
Aqua dest. 500 ml

Die einzelnen Reagenzien wurden miteinander vermischt und die Lösung auf pH 7,4 eingestellt. Alle Reagenzien stammten von der Firma Merck KG, Darmstadt.

Chromgelatinierte Objektträger:

Es wurden Objektträger der Größe 76x26 mm und Deckgläser der Größe 24x60 mm der Firma Menzel-Gläser, Braunschweig, verwandt.

- Gelatine 5 g
Chromalaun 0,5 g
Aqua dest. 1000 ml

Die Gelatine wurde in Aqua dest. bis auf 35°C und nach Zugabe des Chromalauns weiter auf 40°C erwärmt. Anschließend wurde die Lösung in einem Wasserbad auf 15-20°C abgekühlt. Autoklavierte Objektträger wurden für 10 Minuten in die Lösung getaucht und über Nacht im Trockenschrank bei 37°C getrocknet.

Gepuffertes Glycerol:

- Na₂CO₃ (Natriumcarbonat) 53 g/l = 0,5 M
NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonat) 42 g/l = 0,5 M
C₃H₅(OH)₃ (Glycerol) 100 ml

Die beiden Bestandteile der Pufferlösung wurden miteinander vermischt und die Lösung auf pH 8,6 eingestellt. Zwei Teile des Glycerols wurden mit einem Teil Puffer vermischt. Alle Reagenzien stammten von der Firma Merck KG, Darmstadt.

3. Ergebnisse

Es wurden die paravertebralen sympathischen Ganglien SCG und SG, die prävertebralen Ganglien CSMG und IMG der Entwicklungsstadien E14.5-E20.5 sowie von neugeborenen (Postnatum: PN) und adulten Mäusen untersucht. Ergänzend wurden sensorische thorakalen und lumbalen DRG des E15.5 und E16.5 untersucht.

3.1 Superior Cervical Ganglion (SCG)

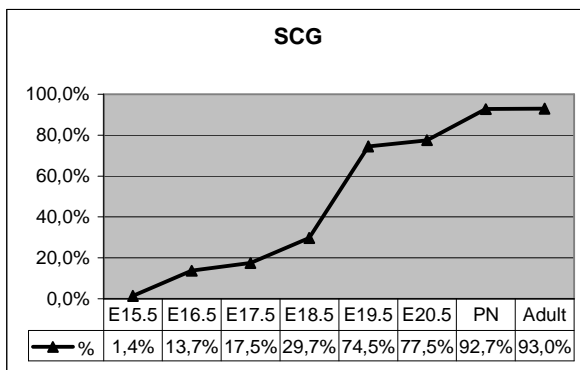
3.1.1 Hämoxygenase-2

Initial (E15.5) konnten nur einige wenige HO-2 positive Ganglienzellen (1,4%) nachgewiesen werden (Abb. 2). An den folgenden Tagen reagierten 13,7% (E16.5) und 17,5% (E17.5, Abb. 3) der untersuchten Ganglienzellen HO-2 positiv. Zwischen E18.5 (Abb. 4) und E19.5 (Abb. 5) konnte ein sprunghafter Anstieg von 29,7% auf 74,5% beobachtet werden. Ab E20.5 (Abb. 6) waren 77,5% und unmittelbar postnatal 92,7% der untersuchten Ganglienzellen HO-2 positiv. Im SCG adulter Mäuse reagierten 93,0% der Ganglienzellen HO-2 positiv (Abb. 7). Eine Übersicht über die einzelnen Ergebnisse ist in Tabelle 5 zusammengestellt. Jedes Stadium wurde jeweils an 3 Embryonen (markiert durch Indizes an den Embryonalstadien) verschiedener Muttertiere untersucht. Grafik 1 illustriert den zeitlichen Verlauf der Häufigkeit HO-2 positiver Neuronen.

Stadium	Neuronen [n]	HO-2 pos. Neuronen [n]	[%]
E15.5 ₁	282	7	2,5
E15.5 ₂	301	2	0,7
E15.5 ₃	435	5	1,1
E15.5_{gesamt}	1018	14	1,4
E16.5 ₁	1907	303	15,9
E16.5 ₂	1991	271	13,6
E16.5 ₃	1866	215	11,5
E16.5_{gesamt}	5764	789	13,7
E17.5 ₁	1887	322	17,1
E17.5 ₂	1612	295	18,3
E17.5 ₃	1597	275	17,2
E17.5_{gesamt}	5096	892	17,5
E18.5 ₁	1334	428	32,1

E18.5 ₂	1033	324	31,4
E18.5 ₃	1043	262	25,1
E18.5_{gesamt}	3410	1014	29,7
E19.5 ₁	1784	1376	77,1
E19.5 ₂	1699	1325	78,0
E19.5 ₃	1782	1219	68,4
E19.5_{gesamt}	5265	3920	74,5
E20.5 ₁	1555	1202	77,3
E20.5 ₂	1241	1015	81,8
E20.5 ₃	1473	1087	73,8
E20.5_{gesamt}	4269	3304	77,4
PN ₁	1678	1574	93,8
PN ₂	1686	1499	88,9
PN ₃	1777	1694	95,3
PN_{gesamt}	5141	4767	92,7
Adult ₁	744	703	94,5
Adult ₂	700	625	89,3
Adult ₃	599	573	95,7
Adult_{gesamt}	2043	1901	93,0

Tabelle 5: Anzahl HO-2 positiver Neuronen in Relation zur Gesamtanzahl im SCG. Die Indizes an den jeweiligen Stadien markieren die einzelnen Embryonen.



Grafik 1: Häufigkeit HO-2 positiver Neuronen des SCG von E15.5 bis zum adulten Stadium.

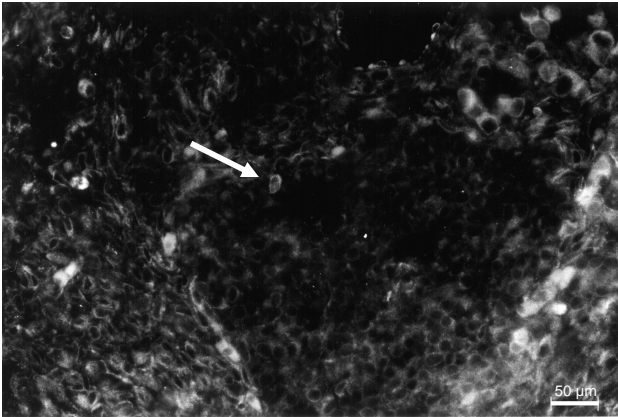


Abb. 2:
SCG des E15.5.
Nachweis eines HO-2 positiven Neurons (Pfeil). Soma positiv, Nucleus negativ.

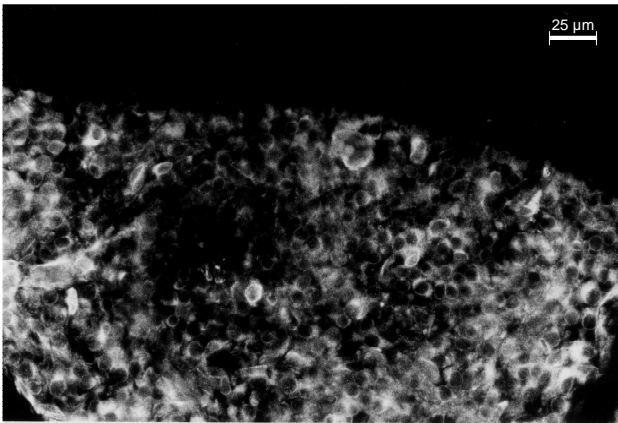


Abb. 3:
SCG des E17.5.
17,5% HO-2 positive Perikarien.

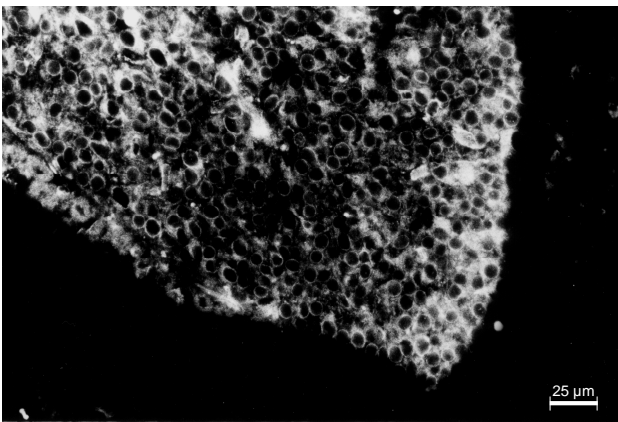


Abb. 4:
SCG des E18.5.
29,7% HO-2 positive Perikarien.

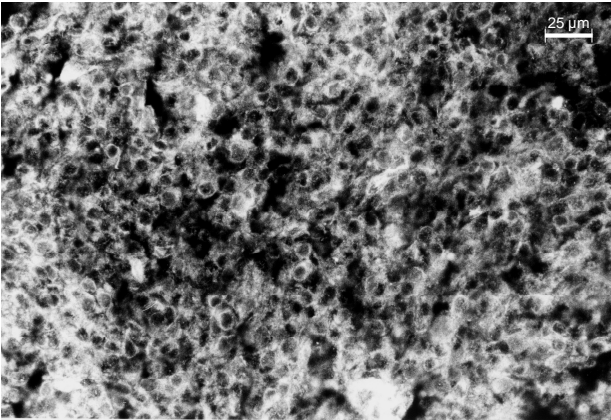


Abb. 5:
SCG des E19.5.
74,5% HO-2 positive
Perikarien.

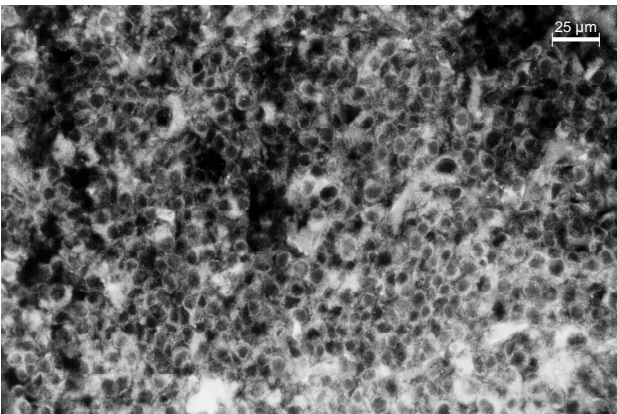


Abb. 6:
SCG des E20.5.
77,4% HO-2 positive
Perikarien.

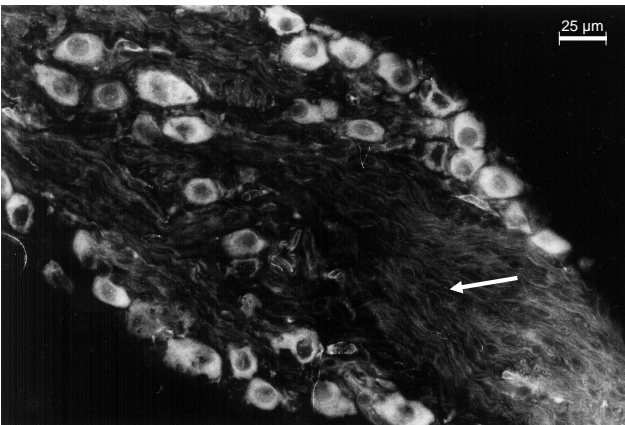


Abb. 7: SCG adult.
93,0% HO-2 positive
Perikarien, Axone
negativ (Pfeil).

Kontrolluntersuchungen ohne Inkubation mit dem Primärantikörper belegten, dass es sich hierbei nicht um unspezifische Proteinbindungen handelte. Kontrolluntersuchungen wurden für jedes Entwicklungsstadium durchgeführt. Exemplarisch zeigen Abbildung 8 und 9 die Kontrolluntersuchung für E19.5 und das adulte Stadium.

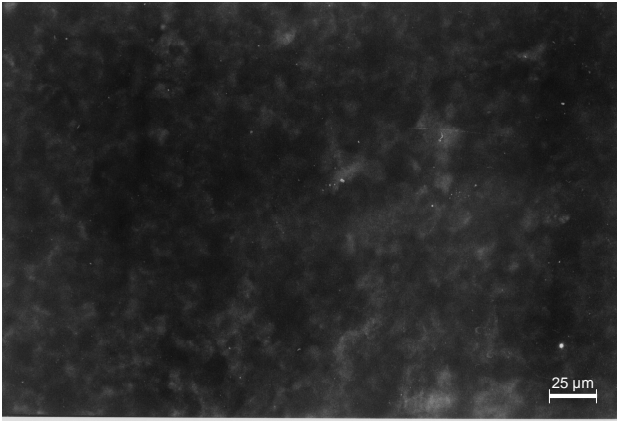


Abb. 8: SCG des E19.5

Kontrolluntersuchung ohne Inkubation mit dem Primärantikörper.

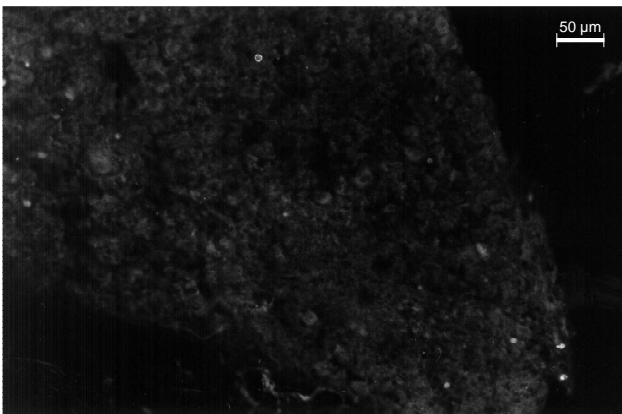


Abb. 9: SCG der adulten Maus.

Kontrolluntersuchung ohne Inkubation mit dem Primärantikörper.

3.1.2 Tyrosinhydroxylase

Bei den durchgeführten Experimenten wurden die Ganglien jedes Stadiums mit anti-TH inkubiert, um damit das Vorliegen eines sympathischen Ganglions zu beweisen. Bereits ab E14.5 konnte TH in einigen Perikarien mit prägnanter Intensität nachgewiesen werden (Abb. 10). Anzahl und Intensität TH positiver Neuronen nahm rascher zu als die der HO-2 positiven Neuronen.

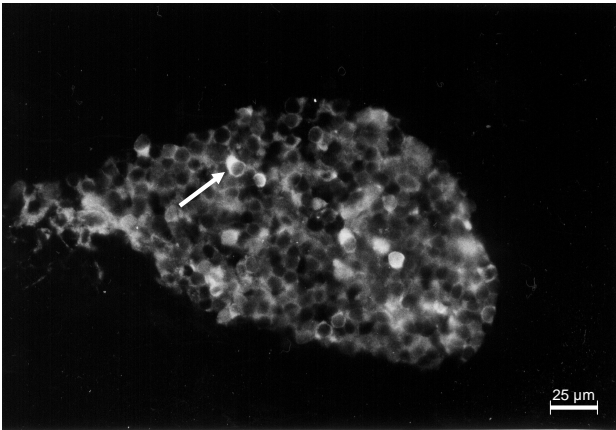


Abb. 10:
SCG des E14.5.
Bereits einige Perikarien waren TH positiv (Pfeil).

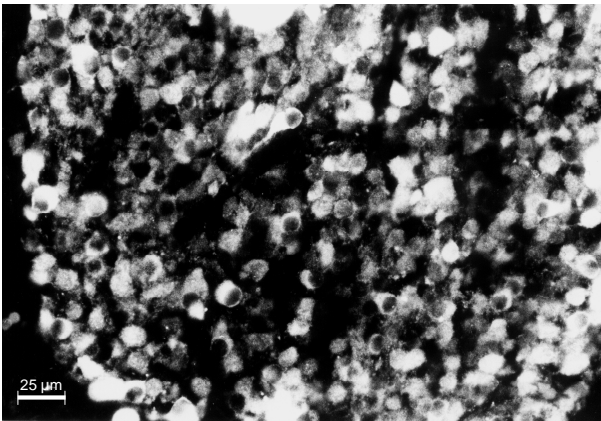


Abb. 11:
SCG des E18.5.
Fast alle Perikarien reagierten TH positiv.

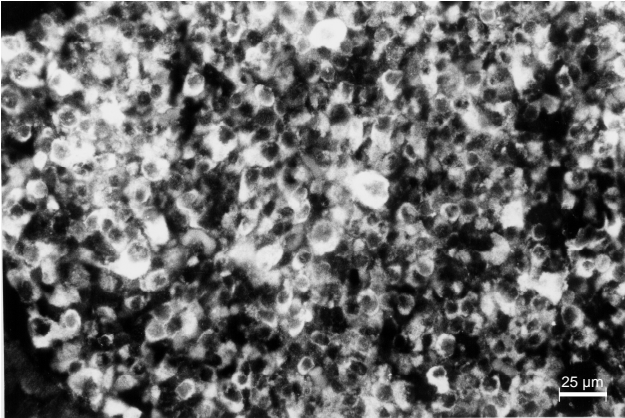


Abb. 12:
SCG des E20.5.
Alle Perikarien rea-
gieren TH positiv.

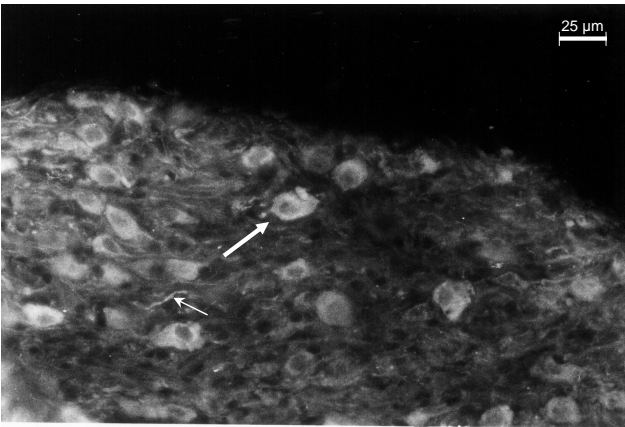


Abb. 13: SCG adult.
TH positive Neuronen
(Pfeil) und einige TH
positive Fasern
(kleiner Pfeil).

3.1.3 Hämoxygenase-1

HO-1 konnte weder in den adulten Ganglienzellen des SCG, noch in den untersuchten Entwicklungsstadien E14.5, E16.5, E18.5, E20.5 nachgewiesen werden. Exemplarisch zeigen Abbildung 14-16 die Stadien E14.5 mit Kontrolluntersuchung und das adulte Stadium.

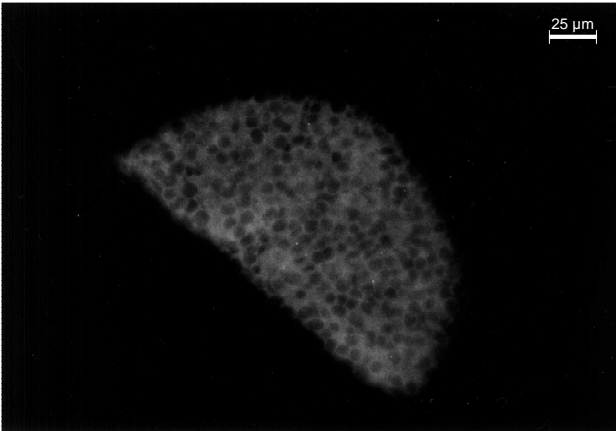


Abb. 14:
SCG des E14.5
Kein Nachweis HO-1
positiver Perikarien.

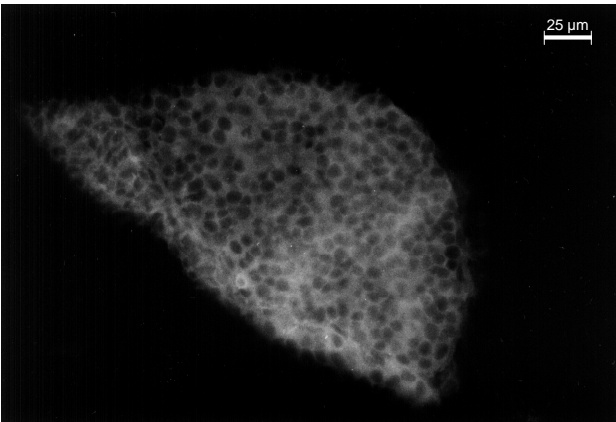


Abb. 15:
SCG des E14.5
Kontrolluntersuchung
ohne Inkubation mit
dem Primärantikörper.

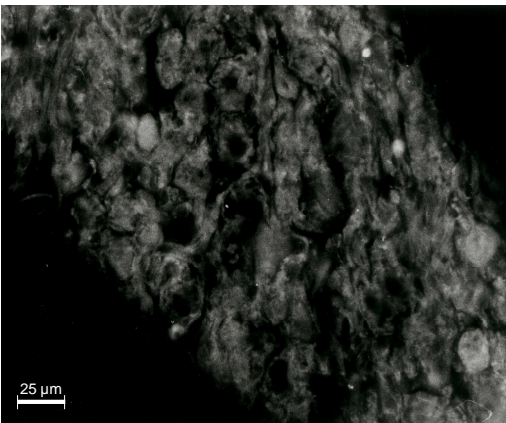


Abb. 16: SCG adult
Kein Nachweis HO-1
positiver Perikarien.

3.2 Stellate Ganglion (SG)

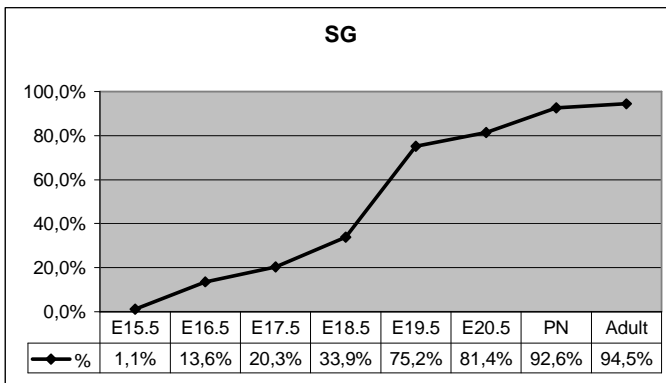
3.2.1 Hämoxygenase-2

Ebenso wie beim SCG reagierten initial (E15.5) nur wenige Ganglienzellen HO-2 positiv (1,1%, Abb. 17). Während des E16.5 und E17.5 (Abb. 18) stieg die Häufigkeit positiver Ganglienzellen von 13,6% auf 20,3% an. Zwischen dem E18.5 (Abb. 19) und E19.5 (Abb. 20) konnte ein sprunghafter Anstieg von 33,9% auf 75,2% beobachtet werden. Unmittelbar vor (E20.5; Abb. 21) und unmittelbar nach der Geburt (PN) reagierten 81,4% bzw. 92,6% der Ganglienzellen HO-2 positiv. Neuronen des SG adulter Mäuse waren zu 94,5% positiv (Abb. 22). Eine Übersicht ist in Tabelle 6 zusammengestellt. Jedes Stadium wurde jeweils an 3 Embryonen (markiert durch Indizes an den Embryonalstadien) verschiedener Muttertiere untersucht. Grafik 2 illustriert den zeitlichen Verlauf der Häufigkeit HO-2 positiver Neuronen.

Stadium	Neuronen [n]	HO-2 pos. Neuronen [n]	[%]
E15.5 ₁	306	4	1,3
E15.5 ₂	423	3	0,7
E15.5 ₃	397	5	1,3
E15.5_{gesamt}	1126	12	1,1
E16.5 ₁	1644	286	17,4
E16.5 ₂	1894	206	10,9
E16.5 ₃	1869	243	13,0
E16.5_{gesamt}	5407	735	13,6
E17.5 ₁	1615	314	19,4
E17.5 ₂	1592	345	21,7
E17.5 ₃	1443	283	19,6
E17.5_{gesamt}	4650	942	20,3
E18.5 ₁	1373	398	29,0
E18.5 ₂	1344	445	33,1
E18.5 ₃	1336	530	39,7
E18.5_{gesamt}	4053	1373	33,9
E19.5 ₁	2062	1463	71,0
E19.5 ₂	1929	1465	75,9
E19.5 ₃	1815	1440	79,3

E19.5_{gesamt}	5806	4368	75,2
E20.5 ₁	1858	1511	81,3
E20.5 ₂	1757	1392	79,2
E20.5 ₃	1948	1626	83,5
E20.5_{gesamt}	5563	4529	81,4
PN ₁	1637	1484	90,7
PN ₂	1551	1457	93,9
PN ₃	1667	1553	93,2
PN_{gesamt}	4855	4494	92,6
Adult ₁	1097	1009	92,0
Adult ₂	1103	1055	95,6
Adult ₃	973	936	96,2
Adult_{gesamt}	3173	3000	94,5

Tabelle 6: Anzahl HO-2 positiver Neuronen in Relation zur Gesamtanzahl im SG. Die Indizes an den jeweiligen Stadien markieren die einzelnen Embryonen.



Grafik 2: Häufigkeit HO-2 positiver Neuronen des SG von E15.5 bis zum adulten Stadium.

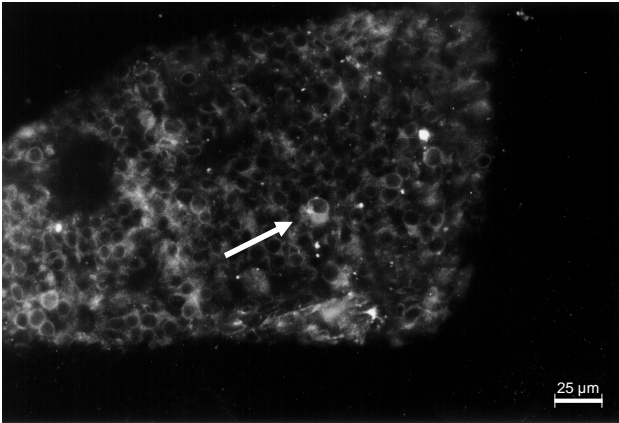


Abb. 17:
SG des E15.5.
Nachweis eines HO-2 positiven Neurons (Pfeil). Soma positiv, Nukleus negativ.

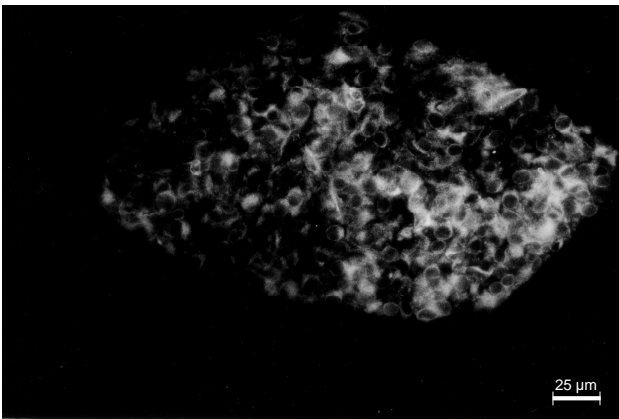


Abb. 18:
SG des E17.5.
20,3% HO-2 positive Perikarien.

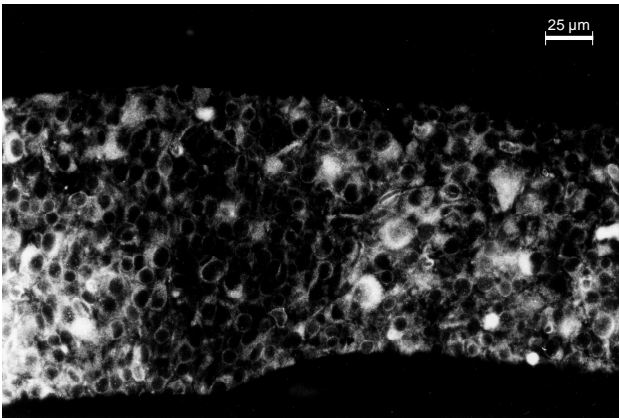


Abb. 19:
SG des E18.5.
33,9% HO-2 positive Perikarien.

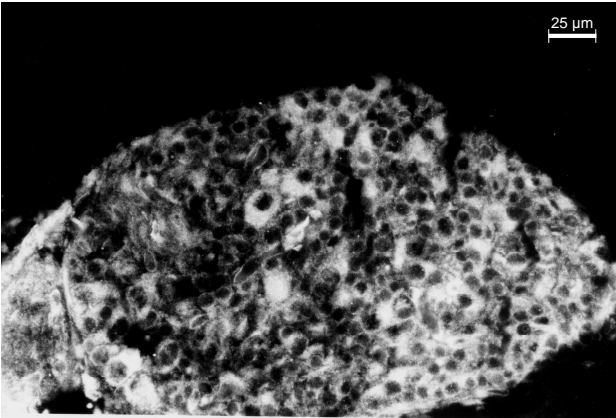


Abb. 20:
SG des E19.5.
75,2% HO-2 positive
Perikarien.

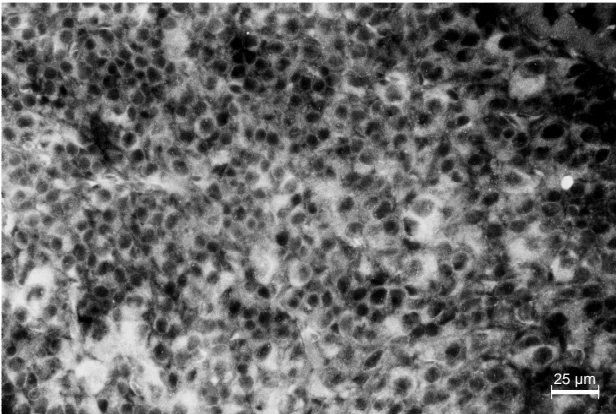


Abb. 21:
SG des E20.5.
81,4% HO-2 positive
Perikarien.

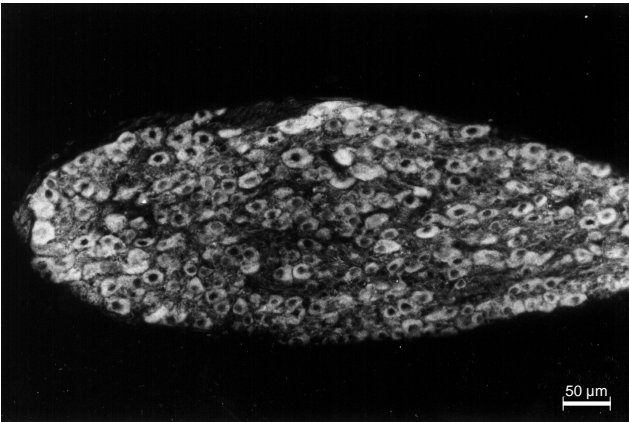


Abb. 22: SG adult.
94,5% HO-2 positive
Perikarien.

Kontrolluntersuchungen ohne Inkubation mit dem Primärantikörper belegten, dass es sich hierbei nicht um unspezifische Proteinbindungen handelte. Kontrolluntersuchungen wurden für jedes Entwicklungsstadium durchgeführt. Exemplarisch zeigen Abbildung 23 und 24 die Kontrolluntersuchung für E19.5 und das adulte Stadium.

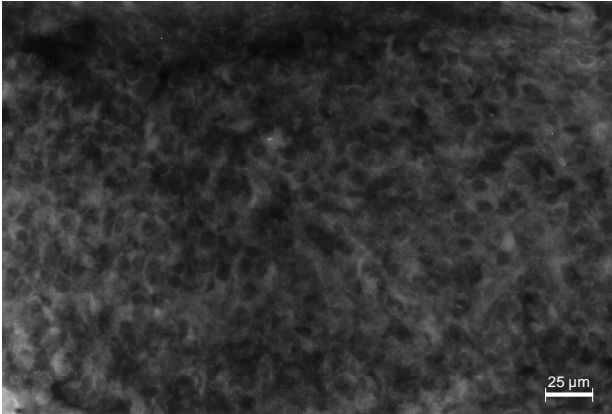


Abb. 23: SG des E19.5

Kontrolluntersuchung ohne Inkubation mit dem Primärantikörper.

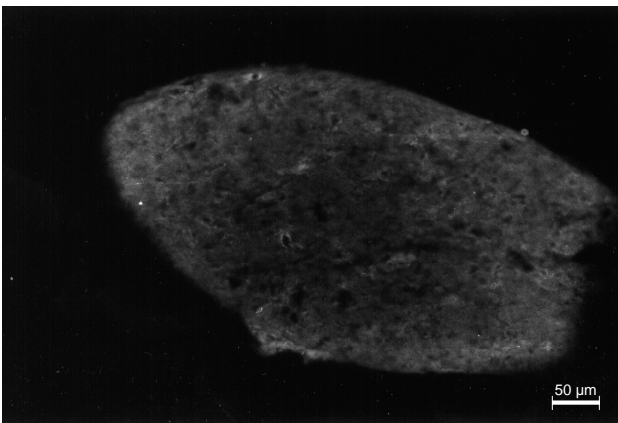


Abb. 24: SG der adulten Maus.

Kontrolluntersuchung ohne Inkubation mit dem Primärantikörper.

3.2.2 Tyrosinhydroxylase

TH konnte bereits ab E14.5 (Abb. 25) mit deutlicher Intensität nachgewiesen werden. Anzahl und Intensität TH positiver Neuronen nahm rascher zu als die der HO-2 positiven Neuronen (Abb. 25, 26).

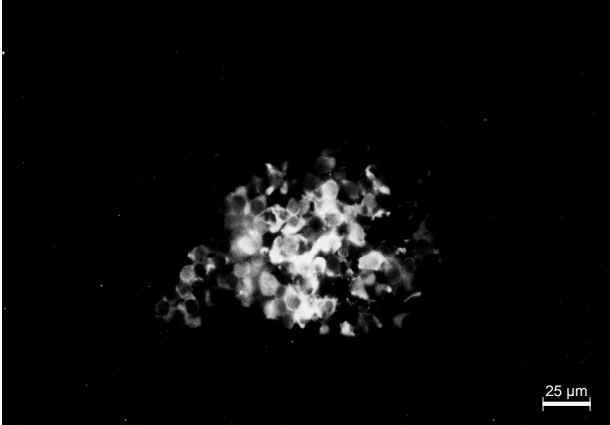


Abb. 25:
SG des E14.5.
Nachweis catechol-
aminergener Neuronen
mit anti-TH.

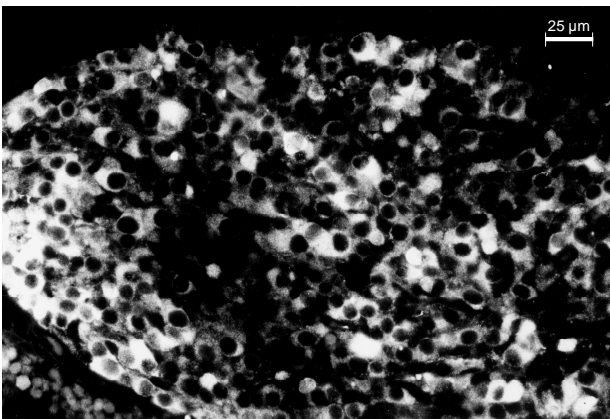


Abb. 26:
SG des E18.5.
Fast alle Neuronen
reagieren TH positiv.

3.2.3 Hämoxigenase-1

HO-1 konnte weder in den adulten Neuronen des SG, noch in den untersuchten Entwicklungsstadien E14.5, E16.5, E18.5, E20.5 nachgewiesen werden. Exemplarisch zeigen Abbildung 27-29 die Stadien E14.5 mit Kontrolluntersuchung und das adulte Stadium.

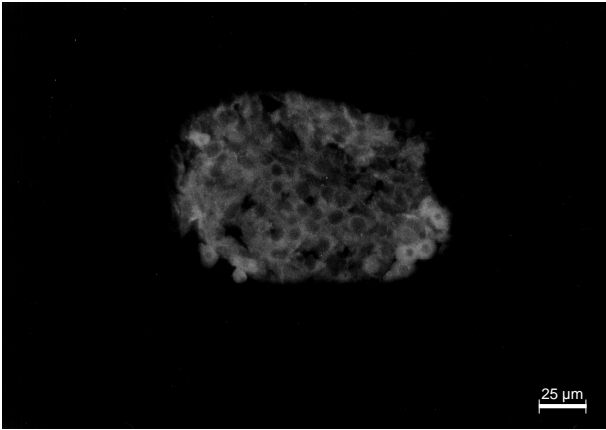


Abb. 27:
SG des E14.5
Kein Nachweis HO-1
positiver Perikarien.

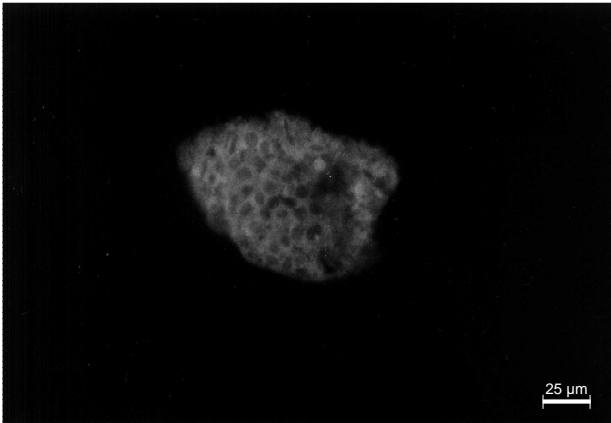


Abb. 28:
SG des E14.5
Kontrolluntersuchung
ohne Inkubation mit
dem Primärantikörper.

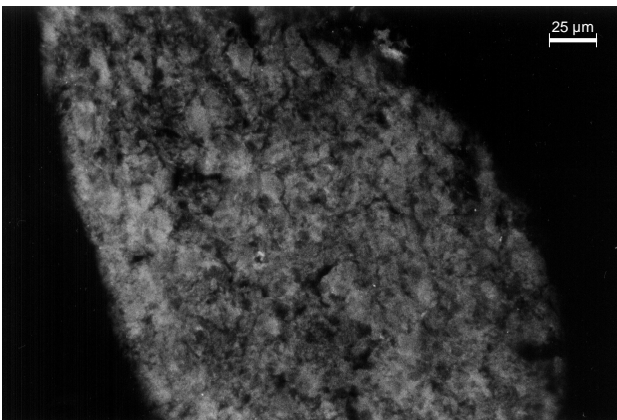


Abb. 29: SG adult
Kein Nachweis HO-1
positiver Perikarien.

3.3 Celiac Superior Mesenteric Ganglion (CSMG)

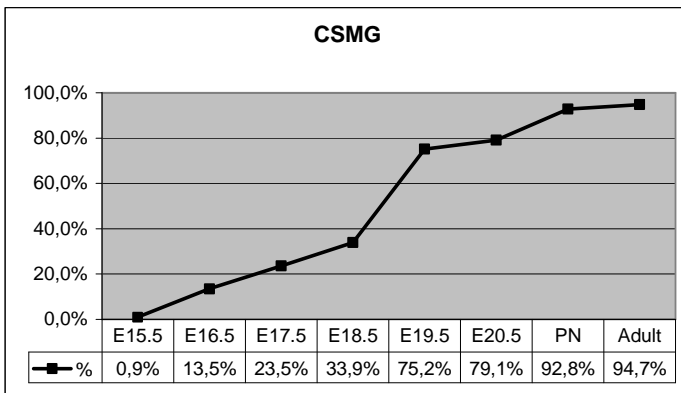
3.3.1 Hämoxygenase-2

Initial (E15.5) wurden nur einige wenige HO-2 positiven Ganglienzellen im CSMG beobachtet (Abb. 30). An den folgenden Tagen nahm die Häufigkeit positiver Ganglienzellen von 13,5% (E16.5) auf 23,5% (E17.5, Abb. 31) und 33,9% zu (E18.5, Abb. 32). Wie bereits bei Neuronen des SCG und SG beobachtet, nahm zwischen dem E18.5 und E19.5 die Häufigkeit HO-2 positiver Neuronen auf 75,2% (Abb. 33) sprunghaft zu. Unmittelbar vor (E20.5; Abb. 34) und unmittelbar nach der Geburt (PN) reagierten 79,1% bzw. 92,8% der Ganglienzellen HO-2 positiv. Neuronen des CSMG adulter Mäuse waren zu 94,7% positiv (Abb. 35). Eine Übersicht ist in Tabelle 7 zusammengestellt. Jedes Stadium wurde jeweils an 3 Embryonen (markiert durch Indizes an den Embryonalstadien) verschiedener Muttertiere untersucht. Grafik 3 illustriert den zeitlichen Verlauf der Häufigkeit HO-2 positiver Neuronen.

Stadium	Neuronen [n]	HO-2 pos. Neuronen [n]	[%]
E15.5 ₁	450	3	0,7
E15.5 ₂	215	1	0,5
E15.5 ₃	448	6	1,3
E15.5_{gesamt}	1113	10	0,9
E16.5 ₁	1810	290	16,0
E16.5 ₂	1636	187	11,4
E16.5 ₃	1648	213	12,9
E16.5_{gesamt}	5094	690	13,5
E17.5 ₁	1385	277	20,0
E17.5 ₂	1361	336	24,7
E17.5 ₃	1312	341	26,0
E17.5_{gesamt}	4058	954	23,5
E18.5 ₁	1365	423	31,0
E18.5 ₂	1275	433	34,0
E18.5 ₃	1315	486	37,0
E18.5_{gesamt}	3955	1342	33,9
E19.5 ₁	1949	1502	77,1
E19.5 ₂	1686	1272	75,4

E19.5 ₃	1893	1382	73,0
E19.5_{gesamt}	5528	4156	75,2
E20.5 ₁	1465	1146	78,2
E20.5 ₂	1639	1262	77,0
E20.5 ₃	1547	1270	82,1
E20.5_{gesamt}	4651	3678	79,1
PN ₁	1683	1576	93,6
PN ₂	1584	1468	92,7
PN ₃	1725	1591	92,2
PN_{gesamt}	4992	4635	92,8
Adult ₁	655	621	94,8
Adult ₂	595	562	94,5
Adult ₃	558	529	94,8
Adult_{gesamt}	1808	1712	94,7

Tabelle 7: Anzahl HO-2 positiver Neuronen in Relation zur Gesamtanzahl im CSMG. Die Indizes an den jeweiligen Stadien markieren die einzelnen Embryonen.



Grafik 3: Häufigkeit HO-2 positiver Neuronen des CSMG von E15.5 bis zum adulten Stadium.

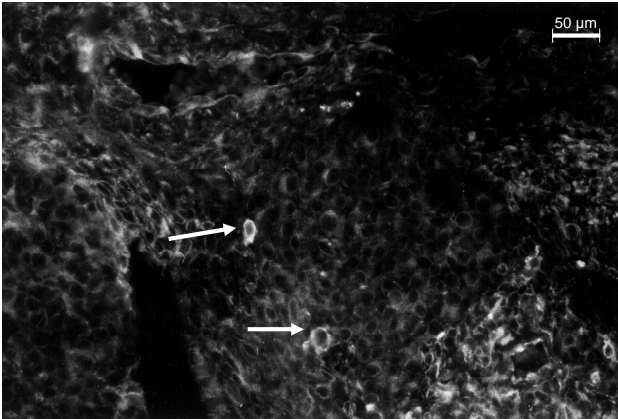


Abb. 30:
CSMG des E15.5.
Nachweis von 2 HO-2
positiven Neuronen
(Pfeile).

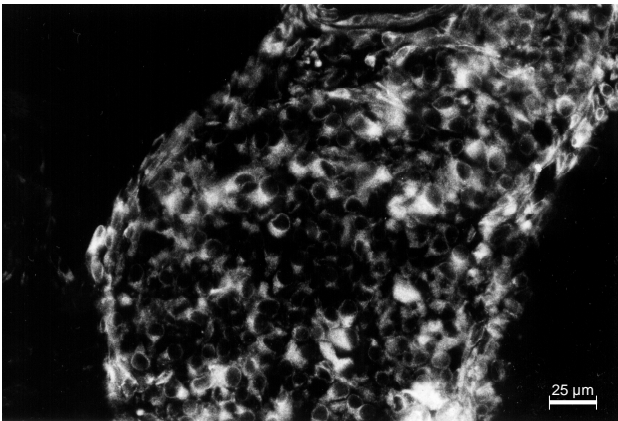


Abb. 31:
CSMG des E17.5.
Nachweis von HO-2
positiven Neuronen
(23,5%).

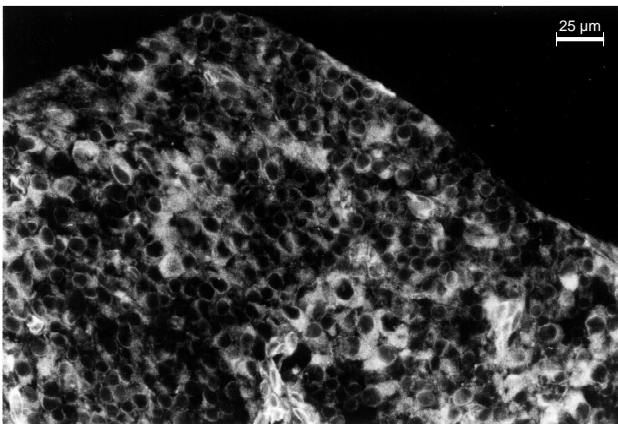


Abb. 32:
CSMG des E18.5.
33,9% HO-2 positive
Perikarien.

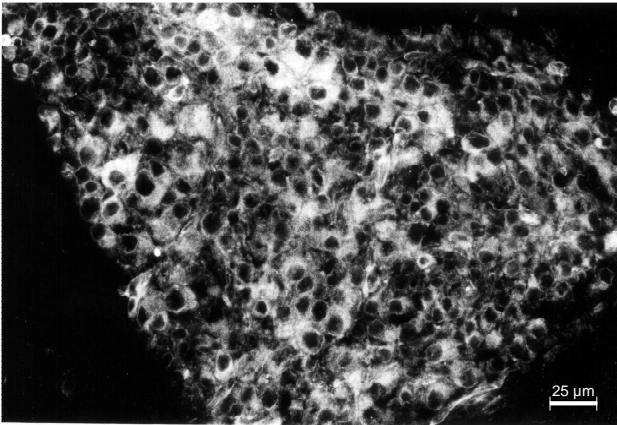


Abb. 33:
CSMG des E19.5.
75,2% HO-2 positive
Perikarien.

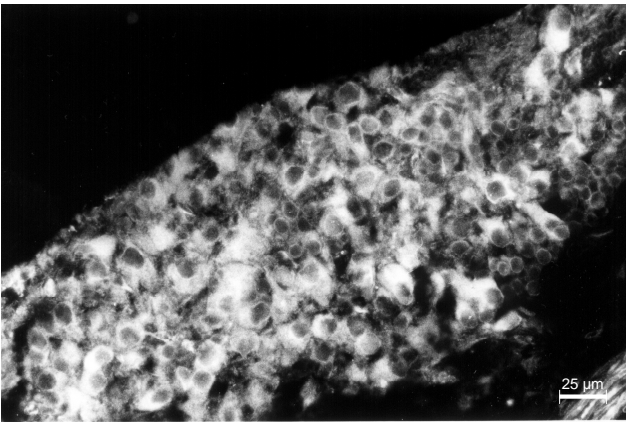


Abb. 34:
CSMG des E20.5.
79,1% HO-2 positive
Perikarien.

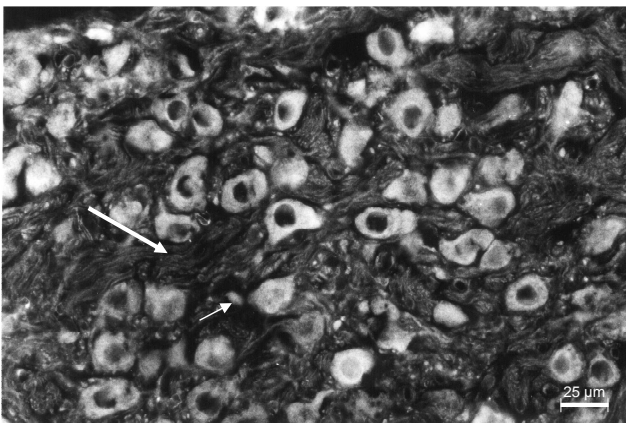


Abb. 35: CSMG adult.
94,7% HO-2 positive
Perikarien. Nachweis
einiger HO-2 positiver
Dendriten (kleiner
Pfeil). Axone negativ
(großer Pfeil).

Kontrolluntersuchungen ohne Inkubation mit dem Primärantikörper belegten, dass es sich hierbei nicht um unspezifische Proteinbindungen handelte. Kontrolluntersuchungen wurden für jedes Entwicklungsstadium durchgeführt. Exemplarisch zeigen Abbildung 36 und 37 die Kontrolluntersuchung für E18.5 und das adulte Stadium.

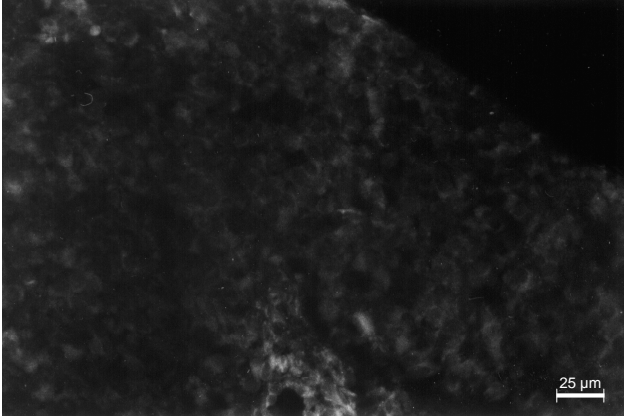


Abb. 36: CSMG des E18.5
Kontrolluntersuchung ohne Inkubation mit dem Primärantikörper.

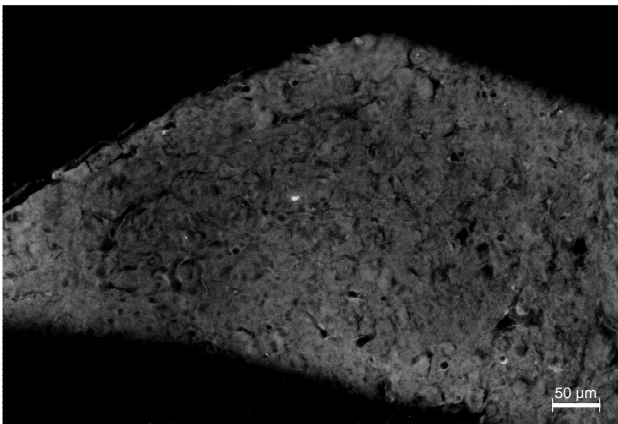


Abb. 37: CSMG der adulten Maus.
Kontrolluntersuchung ohne Inkubation mit dem Primärantikörper.

3.3.2 Tyrosinhydroxylase

TH konnte bereits ab E14.5 (Abb. 38) mit deutlicher Intensität nachgewiesen werden. Anzahl und Intensität TH positiver Neuronen nahm rascher zu als die der HO-2 positiven Neuronen (Abb. 39).

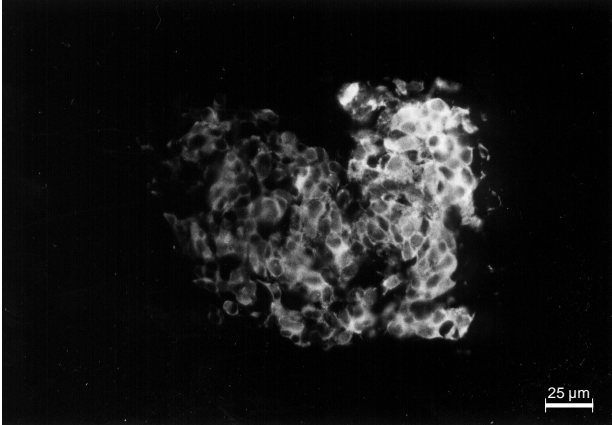


Abb. 38:
CSMG des E14.5.
Nachweis katechol-
aminerger Neuronen
mit anti-TH.

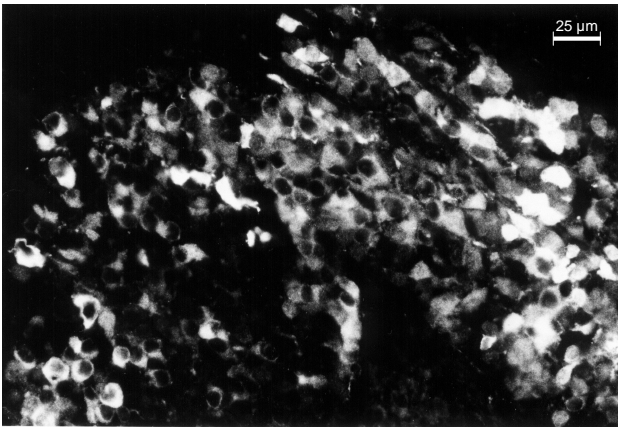


Abb. 39:
CSMG des E18.5.
Fast alle Ganglien-
zellen reagierten TH
positiv.

3.3.3 Hämoxigenase-1

HO-1 konnte weder in den adulten Neuronen des CSMG, noch in den untersuchten Entwicklungsstadien E14.5, E16.5, E18.5, E20.5 nachgewiesen werden. Exemplarisch zeigen Abbildung 40-42 die Stadien E14.5 mit Kontrolluntersuchung und das adulte Stadium.

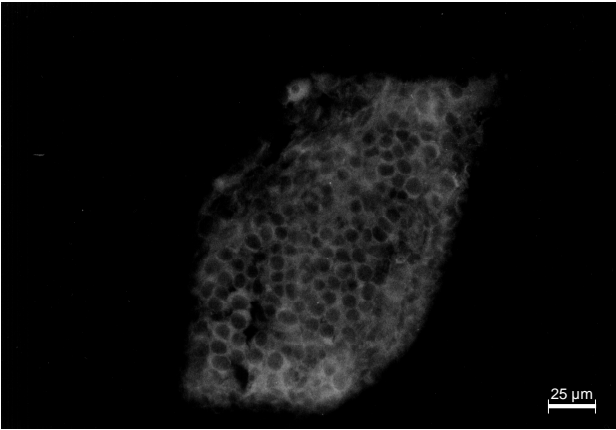


Abb. 40:
CSMG des E14.5.
Kein Nachweis HO-1
positiver Neuronen.

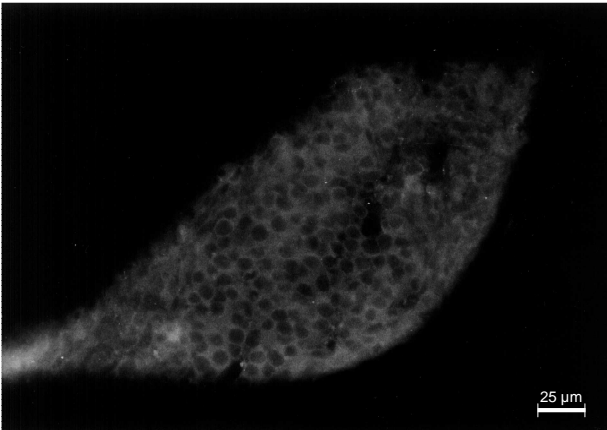


Abb. 41:
CSMG des E14.5.
Kontrolluntersuchung
ohne Inkubation mit
dem Primärantikörper.

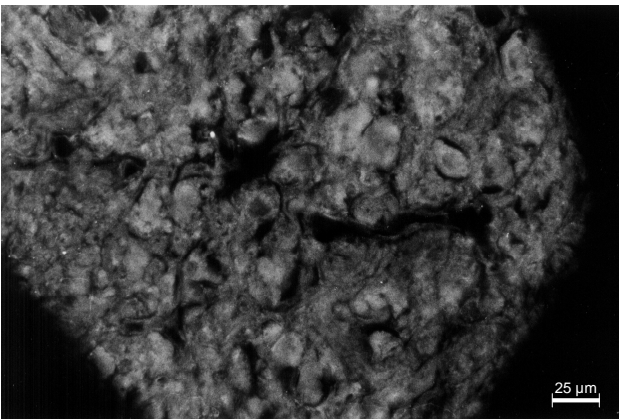


Abb. 42:
CSMG adult
Kein Nachweis HO-1
positiver Neuronen.

3.4 Inferior Mesenteric Ganglion (IMG)

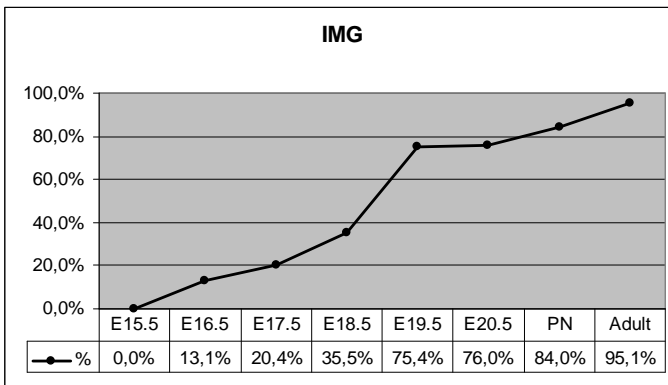
3.4.1 Hämoxygenase-2

Nur in einzelnen Fällen konnten HO-2 positive Ganglienzellen bereits am E15.5 nachgewiesen werden (Abb. 43). Nach einer Häufigkeitszunahme HO-2 positiver Ganglienzellen von 13,1% (E16.5) auf 20,4% (E17.5, Abb. 44) und 35,5% (E18.5, Abb. 45) konnte ein sprunghafter Anstieg auf 75,5% (E19.5) beobachtet werden. Einen Tag vor Geburt (E20.5, Abb. 46) reagierten 76,0 % und einen Tag nach der Geburt (PN) 84,0% der untersuchten Neuronen HO-2 positiv. Neuronen des IMG adulter Mäuse waren zu 95,1% positiv (Abb. 47). Eine Übersicht ist in Tabelle 8 zusammengestellt. Jedes Stadium wurde jeweils an 3 Embryonen (markiert durch Indizes an den Embryonalstadien) verschiedener Muttertiere untersucht. Grafik 4 illustriert den zeitlichen Verlauf der Häufigkeit HO-2 positiver Neuronen.

Stadium	Neuronen [n]	HO-2 pos. Neuronen [n]	[%]
E15.5 ₁	180	0	0,0
E15.5 ₂	201	0	0,0
E15.5 ₃	252	2	0,8
E15.5_{gesamt}	633	2	0,0
E16.5 ₁	805	168	20,9
E16.5 ₂	1254	151	12,0
E16.5 ₃	946	74	7,8
E16.5_{gesamt}	3005	393	13,1
E17.5 ₁	1403	299	21,3
E17.5 ₂	1299	239	18,4
E17.5 ₃	1362	291	21,4
E17.5_{gesamt}	4064	829	20,4
E18.5 ₁	1398	410	29,3
E18.5 ₂	1238	444	35,9
E18.5 ₃	1298	541	41,7
E18.5_{gesamt}	3934	1395	35,5
E19.5 ₁	1416	1075	75,9
E19.5 ₂	1656	1206	72,8
E19.5 ₃	1667	1291	77,4

E19.5_{gesamt}	4739	3572	75,4
E20.5 ₁	684	531	77,6
E20.5 ₂	1205	908	75,4
E20.5 ₃	1521	1152	75,7
E20.5_{gesamt}	3410	2591	76,0
PN ₁	1094	861	78,7
PN ₂	1008	892	88,5
PN ₃	887	759	85,6
PN_{gesamt}	2989	2512	84,0
Adult ₁	92	88	95,7
Adult ₂	87	82	94,3
Adult ₃	88	84	95,5
Adult_{gesamt}	267	254	95,1

Tabelle 8: Anzahl HO-2 positiver Neuronen in Relation zur Gesamtzahl im IMG.
Die Indizes an den jeweiligen Stadien markieren die einzelnen Embryonen.



Grafik 4: Häufigkeit HO-2 positiver Neuronen des IMG von E15.5 bis zum adulten Stadium.

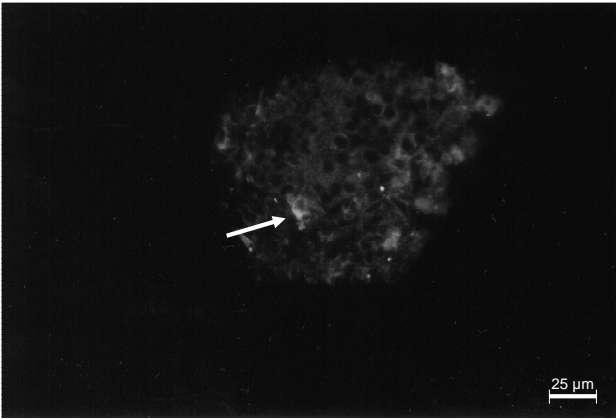


Abb. 43:
IMG des E15.5.
Nachweis eines HO-2
positiven Neurons
(Pfeil).

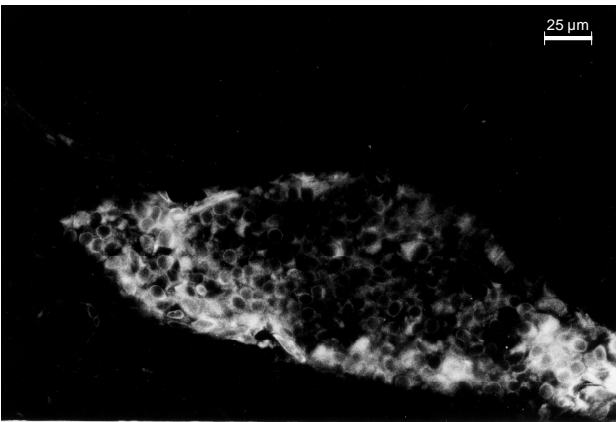


Abb. 44:
IMG des E17.5.
20,4% HO-2 positive
Perikarien.

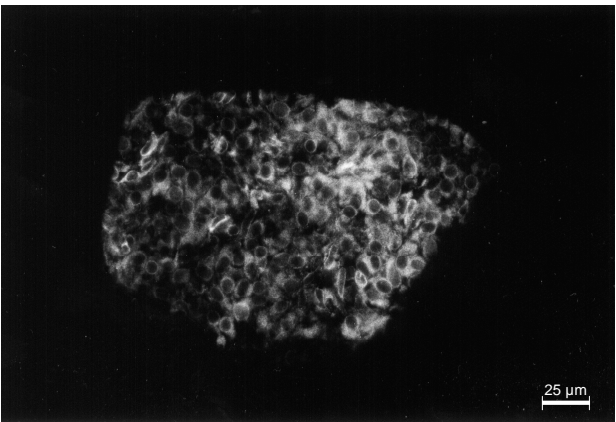


Abb. 45:
IMG des E18.5.
35,5% HO-2 positive
Perikarien.

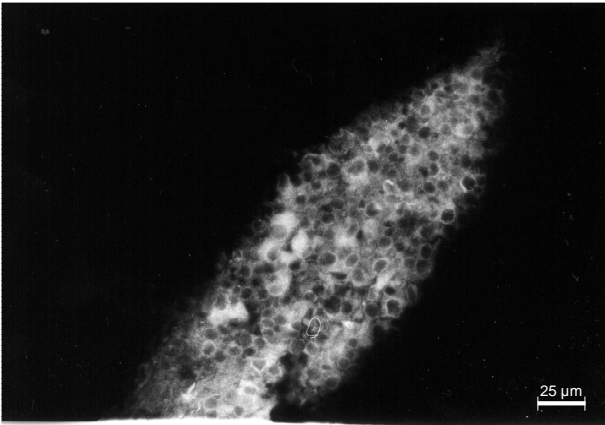


Abb. 46:
 IMG des E20.5.
 76,0% HO-2 positive
 Perikarien.

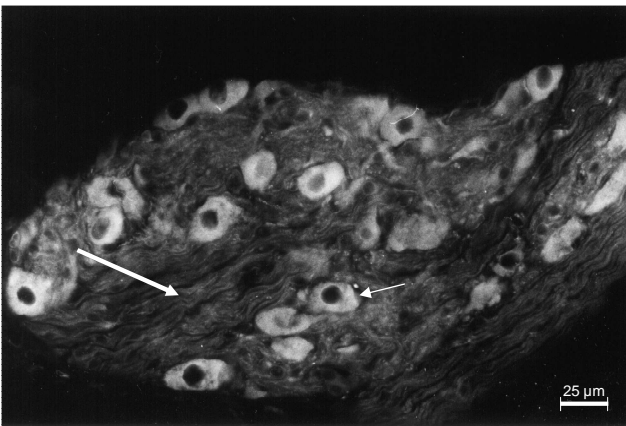


Abb. 47: IMG adult.
 95,1% HO-2 positive
 Perikarien. Somata
 positiv (kleiner Pfeil),
 Axone negativ
 (großer Pfeil).

Kontrolluntersuchungen ohne Inkubation mit dem Primärantikörper belegten, dass es sich hierbei nicht um unspezifische Proteinbindungen handelte. Kontrolluntersuchungen wurden für jedes Entwicklungsstadium durchgeführt. Exemplarisch zeigen Abbildung 48 und 49 die Kontrolluntersuchung für E20.5 und das adulte Stadium.



Abb. 48: IMG des E20.5.
Kontrolluntersuchung ohne Inkubation mit dem Primärantikörper.

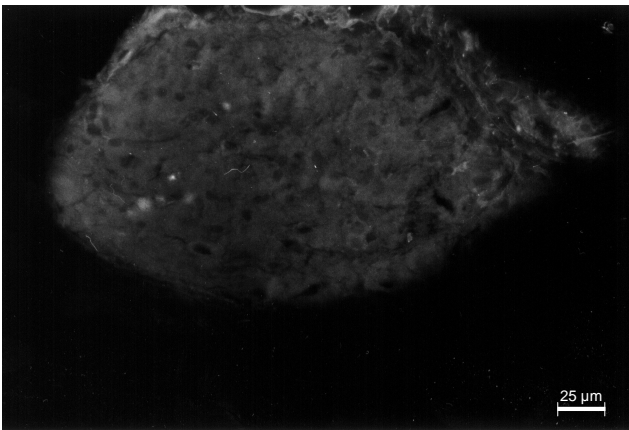


Abb. 49: IMG der adulten Maus.
Kontrolluntersuchung ohne Inkubation mit dem Primärantikörper.

3.4.2 Tyrosinhydroxilase

TH konnte bereits ab E14.5 (Abb. 50) mit deutlicher Intensität nachgewiesen werden. Anzahl und Intensität TH positiver Neuronen nahm rascher zu als die der HO-2 positiven Neuronen. Abb. 50 zeigt TH für das adulte Stadium.

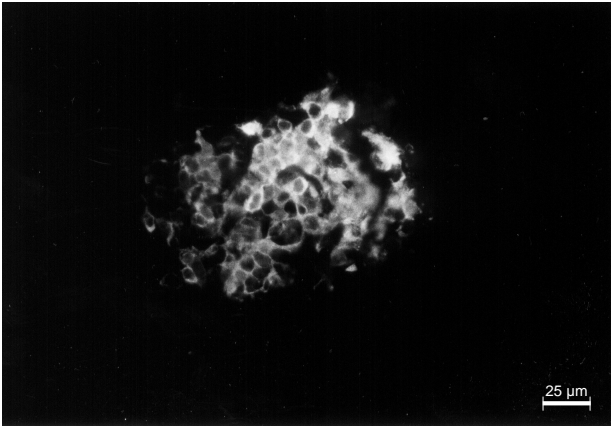


Abb. 49:
IMG des E14.5.
Nachweis catechol-
aminерger Neuronen
mit anti-TH.

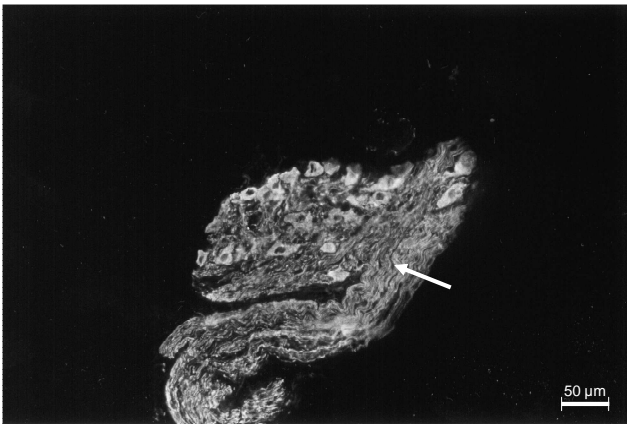


Abb. 50: IMG adult.
Nachweis catechol-
aminерger Neuronen
und Axone (Pfeil) mit
anti-TH.

3.4.3 Hämoxigenase-1

HO-1 konnte weder in den adulten Neuronen des IMG, noch in den untersuchten Entwicklungsstadien E14.5, E16.5, E18.5, E20.5 nachgewiesen werden. Exemplarisch zeigen Abbildung 51-53 die Stadien E14.5 mit Kontrolluntersuchung und das adulte Stadium.

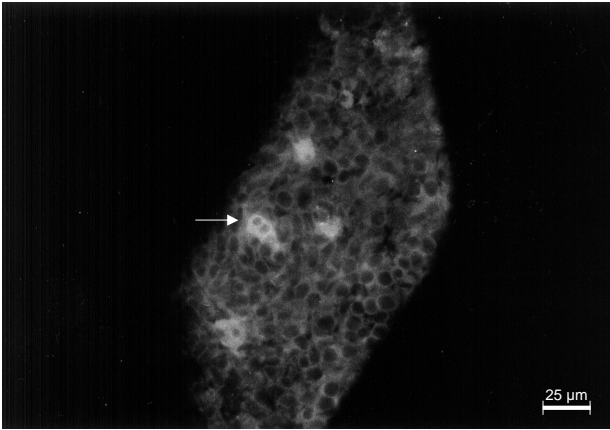


Abb. 51:
IMG des E14.5
Kein Nachweis HO-1
positiver Neuronen.
Pfeil: embryonale
Erythroblasten

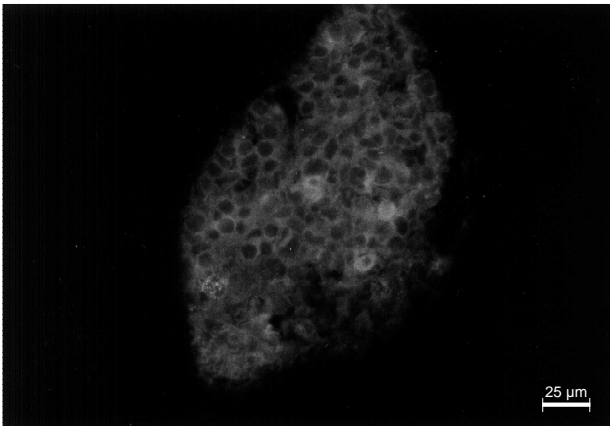


Abb. 52:
IMG des E14.5
Kontrolluntersuchung
ohne Inkubation mit
dem Primäranti-
körper.

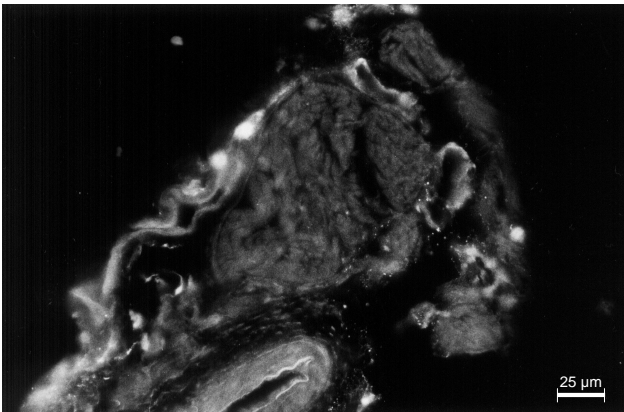
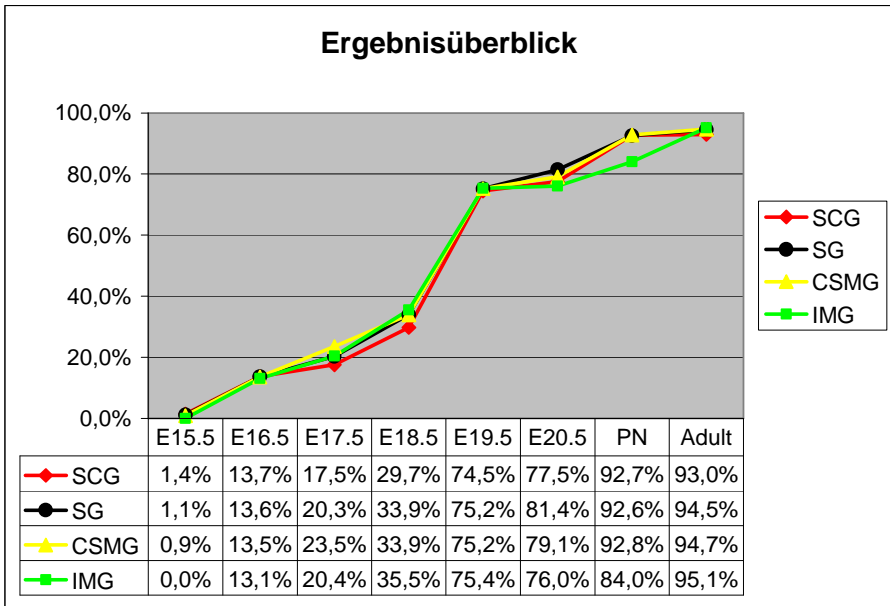


Abb. 53: IMG adult
Kein Nachweis HO-1
positiver Perikarien.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Initial (E15.5) gelang der Nachweis von HO-2 nur in einzelnen Perikarien (0-1,4%) der untersuchten sympathischen Ganglien. Zwischen E18.5 und E19.5 nahm die Häufigkeit HO-2 positiver Perikarien von 35,5% auf 75,4% in allen untersuchten Ganglien sprunghaft zu. Grafik 5 zeigt, dass die Häufigkeit HO-2 positiver Perikarien sigmoid zunahm. Zwischen den paravertebralen und den prävertebralen Ganglien gab es keine kraniokaudalen Entwicklungsunterschiede.



Grafik 5: Vergleich der Häufigkeit HO-2 positiver Neuronen in den sympathischen Ganglien.

Die HO-2 Immunreaktivität setzte nicht abrupt ein, sondern die Intensität nahm kontinuierlich zu. Unmittelbar vor Geburt (E20.5) waren bis zu 81,4% der Ganglienzellen HO-2 positiv. Damit war die Entwicklung der HO-2 Proteinbiosynthese jedoch noch nicht abgeschlossen. Vielmehr setzte sich die Entwicklung in allen untersuchten Ganglien postnatal weiter fort. Unmittelbar nach Geburt (PN) reagierten bis zu 92,8% der Ganglienzellen HO-2 positiv und im adulten Stadium bis zu 95,1%. Der Nachweis von HO-1 gelang weder in den adulten Perikarien der untersuchten sympathischen Ganglien, noch in den jeweiligen Entwicklungsstadien E14.5, E16.5, E18.5, E20.5.

3.6 Dorsal Root Ganglion (DRG)

Ergänzend zu den Untersuchungen an den sympathischen Ganglien wurde zusätzlich sensorische thorakale und lumbale DRG exemplarisch untersucht (E15.5 und E16.5). Dabei fielen zeitliche Unterschiede zwischen dem sympathischen und dem sensorischen System auf. Bereits ab E14.5 gelang der Nachweis von HO-2 in einigen Perikarien. Einen Tag später (E15.5) reagierten 17,9% (Abb. 54) und einen weiteren Tag später (E16.5) 30,2 % (Abb. 55) der Ganglienzellen HO-2 positiv. Ab dem E18.5 (Abb. 56) waren bereits fast alle Neuronen HO-2 positiv – wie im adulten Stadium (Abb. 57). Grafik 6 zeigt, dass im Vergleich zu den untersuchten sympathischen Ganglien HO-2 in den sensorischen Perikarien der DRG wesentlich früher nachgewiesen werden konnte.

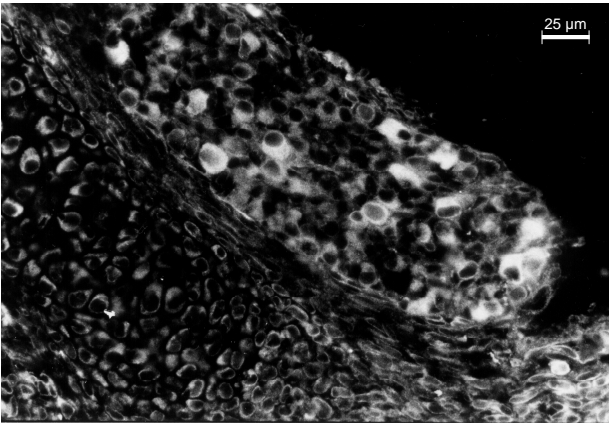


Abb. 54: DRG (LWS) des E15.5. Nachweis HO-2 positiver Perikarien (17,9%).

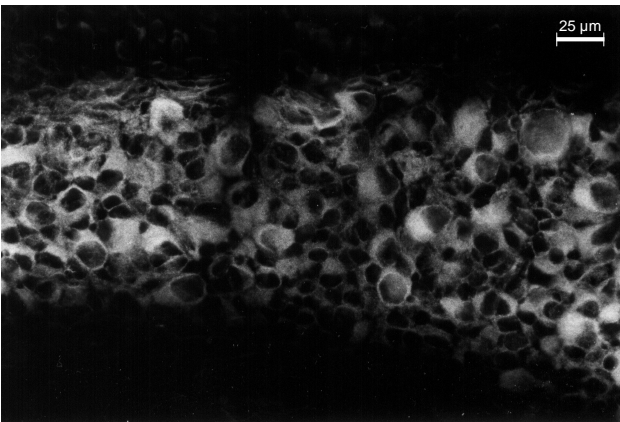


Abb. 55: DRG (LWS) des E16.5. 30,2% HO-2 positive Perikarien.

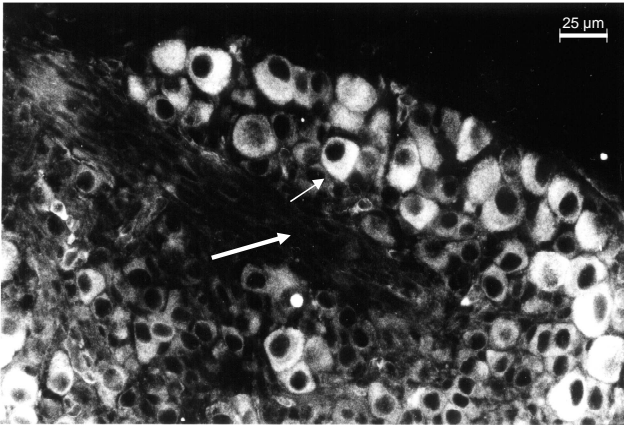


Abb. 56: DRG (BWS) des E18.5. Nachweis HO-2 positiver Perikarien (100%). Soma positiv, Nukleus negativ (kleiner Pfeil). Axone negativ (großer Pfeil).

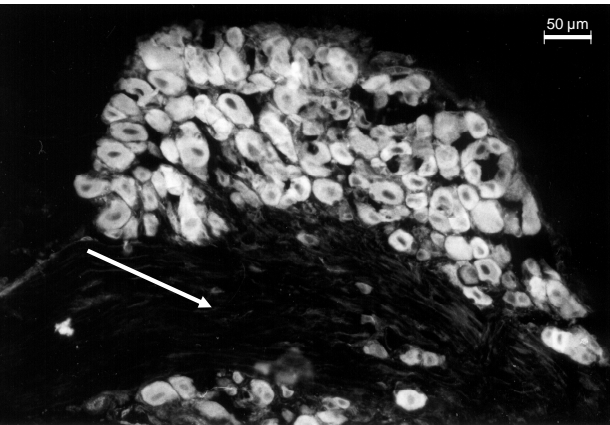
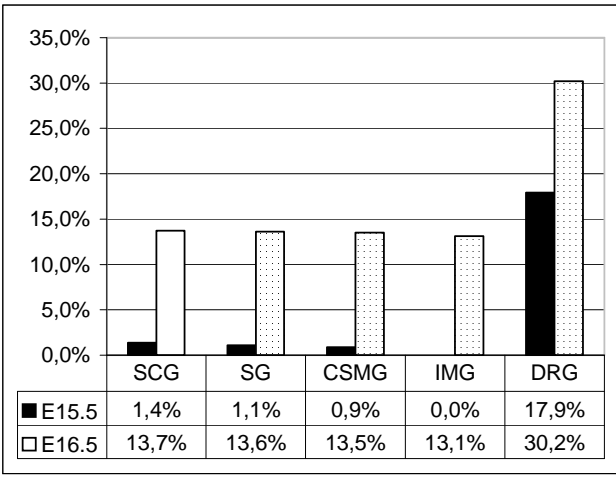


Abb. 57: DRG (BWS) adult. Nachweis HO-2 positiver Perikarien. Axone negativ (Pfeil).



Grafik 6: Vergleich der Häufigkeit HO-2 positiver Neuronen in sympathischen und sensorischen Ganglien am E15.5 und E16.5.

4. Diskussion

4.1 HO-2 während der embryonalen Entwicklung sympathischer Ganglien

Es wurden die paravertebralen sympathischen Ganglien SCG und SG sowie die prävertebralen Ganglien CSMG und IMG der Entwicklungsstadien E14.5-E20.5, von neugeborenen und adulten Mäusen untersucht.

Die Untersuchungen zeigten, dass HO-2 in sympathischen Ganglien der adulten Maus nachgewiesen werden kann, wie es zuvor bei anderen Spezies, z. B. beim Meerschweinchen [Vollerthun et al., 1995] und bei der Ratte [Zakhary et al., 1996] beschrieben wurde. Dies ist jedoch die erste Untersuchung, die HO-2 in sympathischen Ganglien während der Embryonalzeit nachweisen konnte. Initial (E15.5) gelang der HO-2 Nachweis in nur einzelnen Perikarien. Zwischen E18.5 und E19.5 nahm die Häufigkeit HO-2 positiver Zellen von 35,5% auf 75,4% sprunghaft zu. Es konnte gezeigt werden, dass in allen untersuchten Ganglien die Häufigkeit HO-2 positiver Perikarien sigmoid zunahm. Die HO-2 Immunreaktivität setzte nicht abrupt ein, sondern die Intensität nahm kontinuierlich zu. Unmittelbar vor Geburt (E20.5) waren bis zu 81,4% der Ganglienzellen HO-2 positiv. Die Zunahme an positiven Perikarien war damit noch nicht abgeschlossen, sondern setzte sich in allen untersuchten Ganglien postnatal weiter fort. Unmittelbar nach Geburt (PN) reagierten bis zu 92,8% der Ganglienzellen HO-2 positiv und im adulten Stadium bis zu 95,1%. Dass mit der Geburt die HO-2 Proteinbiosynthese ihren höchsten Level noch nicht erreicht hat, konnte auch bei anderen Spezies beobachtet werden. Einen Tag vor Geburt bis zum adulten Stadium steigt die HO-2 Proteinbiosynthese in Rattengehirnen um das 2-fache an [Sun et al., 1990].

Es konnten keine signifikanten kraniokaudalen Entwicklungsunterschiede von HO-2 in den untersuchten sympathischen Ganglien gezeigt werden. An sich sind kraniokaudale Entwicklungsunterschiede in der Embryologie nichts ungewöhnliches: Sie sind z.B. bei den Somitenpaaren, die das Axialskelett bilden werden, zu beobachten. Das paraxiale Mesoderm gliedert sich zu beiden Seiten der Chorda dorsalis würfelförmig zu den Somiten. Das erste Somitenpaar entsteht in der Höhe des kranialen Endes der Chorda, die anschließenden Somitenpaare werden von kranial nach kaudal nacheinander gebildet. Bei der Maus können die ersten 7 Somitenpaare ab E8 beobachtet werden [Kaufmann et al., 1999]. Zu Beginn der Neuroblastenmigration aus der Neuralleiste (E10) [Troy et al., 1990] haben sich bereits 25-30 Somitenpaare und zu Beginn der Bildung sympathischer Ganglien (E13.5) [Fagan et al., 1996] 60 Somitenpaare gebildet [Kaufmann et al., 1999].

Der kraniokaudale Entwicklungsunterschied zwischen den paravertebralen sympathischen Ganglien SCG und SG (Beginn des E13.5 [Fagan et al., 1996]) und den prävertebralen sympathischen Ganglien CSMG und IMG (bis Mitte des E13.5 [Kaufmann et al., 1999]) beträgt weniger als einen halben Tag. Somit konnte bei dem gewählten Zeitfenster keine kraniokaudalen Entwicklungsunterschiede in den Ganglien hinsichtlich HO-2 gefunden werden. Grundsätzlich können auch Enzyme in den Organsystemen einen kraniokaudalen Entwicklungsunterschied aufweisen. Die zytosolische Glutathionperoxidase (cGPx) wirkt antioxidativ und kommt ubiquitär vor [Baek et al., 2005]. Der Nachweis von cGPx mRNA gelang im sich entwickelnden Telencephalon und Diencephalon ab E10.5 und im Rückenmark ab E14.5 [Baek et al., 2005]. C-Jun N-terminal Kinase (JNK) ist für die neuronale Entwicklung von Bedeutung. JNK ist eine Schlüsselkomponente des Signaltransduktionsweges der neuronalen Differenzierung und Migration [Hirai et al., 2002]. JNK wird von MAP kinase upstream kinase (MUK) aktiviert [Hirai et al., 1996]. Der immunhistochemische Nachweis von MUK gelang im Mittelhirn und Rhombenzephalon ab E10, im Rückenmark und in den Neuroblasten sympathischer Ganglien ab E11 [Hirai et al., 2005].

4.2 Lokalisation von HO-2 in sympathischen Ganglien

Bei den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass HO-2 stets in den Perikarien, in den Axonen jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Dieses Phänomen wurde bereits bei Untersuchungen sympathischer und sensorischer Ganglien anderer Spezies beobachtet, z.B. beim Meerschweinchen [Vollerthun et al., 1995, 1996]. Allerdings existieren widersprüchliche Angaben über das axonale Vorkommen von HO-2. Zakhary et al. [1996] fanden HO-2 positive Nervenfasern an Gefäßen. HO-2 wurde in einigen Nervenfasern und in nonneuronalen Zellen zwischen den glatten Muskelzellen des Magens [Porcher et al., 1999] und des Jejunums nachgewiesen [Miller et al., 2001].

Die Diskrepanz des HO-2 Nachweises zwischen den Perikarien und den Nervenfasern könnte in unterschiedlichen Proteinmengen, die an beiden Lokalisationen vorhanden sind, begründet sein. Womöglich liegen im Axon Proteinmengen vor, die unter Normalbedingungen immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden können. Für die neuronale Isoform der NO-Synthase (nNOS) wurde in sensorischen Neuronen ähnliches beschrieben. Fischer et al. [1996] fiel die Diskrepanz zwischen zahlreichen nNOS positiven Perikarien und wenigen nNOS positiven Nervenfasern in den Atemwegen des Meerschweinchens auf. nNOS wurde überwiegend in den sensiblen vagalen Ganglien identifiziert, tracheale und peribronchiale Ganglien reagierten jedoch negativ. NOS positive

Nervenfasern wurde in der Schicht glatter Muskelzellen und einzelne Fasern im respiratorischen Epithel nachgewiesen. Fasern, welche die submuköse Drüsen innervieren, waren negativ. Fischer et al. [1996] schlossen daraus, dass NO nach elektrischer Feldstimulation mehr von extrinsischen als von intrinsischen Neuronen freigesetzt wird. Von nNOS wurden zwei alternative mRNA-Spleißvarianten beschrieben [Oberbäumer et al., 1998]. Bei einer Isoform fehlt Exon 2, welches für die Membrananheftung während des axonalen Transportes von Bedeutung ist [Oberbäumer et al., 1998]. Für HO-2 wurden drei mRNA-Spleißvarianten identifiziert: rHO-2, rHO-2-1, rHO-2-2 [McCoubrey et al., 1995; Liu et al., 2000]. Diese differieren lediglich im Bereich des nicht-translatierten Exon-1. Unterschiedliche HO-2 Proteinvarianten, welche die Differenz zwischen Perikarien und Nervenfasern erklären würden, sind bislang nicht publiziert worden.

4.3 Vergleich sympathischer versus sensorischer Ganglien.

Bei den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in den sensorischen Perikarien der DRG HO-2 wesentlich früher als in sympathischen Ganglien nachgewiesen werden konnte. Bereits ab E14.5 reagierten einige Perikarien HO-2 positiv. Während am E15.5 max. in 1,4% der Perikarien der untersuchten sympathischen Ganglien HO-2 nachgewiesen werden konnte, wurde in den sensorischen Perikarien der DRG mit 17,9% 10mal häufiger HO-2 nachgewiesen (Grafik 6). Einen Tag später (E16.5) reagierten circa doppelt so viele (30,2% vs. 13,1%) und am E18.5 dreimal so viele (100% vs. 35,5%) sensorische wie sympathische Neuronen HO-2 positiv. Somit beginnt die HO-2 Proteinbiosynthese in den sensorischen Ganglien 2-3 Tage früher als in den sympathischen Ganglien. Die Differenz zwischen den sympathischen und sensorischen Ganglien dürfte in der unterschiedlich schnellen Entwicklung begründet sein. Die Neuroblasten migrieren ab E10 aus der Neuralleiste [Troy et al., 1990] und formieren sich zu Beginn des E13.5 (SCG und SG [Fagan et al., 1996]) und bis Mitte des E13.5 (CSMG und IMG [Kaufmann et al., 1999]) zu einem sympathischen Ganglion. Die Neuroblasten der sensorischen DRG migrieren ebenfalls ab dem E10 aus der Neuralleiste, formieren sich jedoch bereits während des E11 zu einem Ganglion [Troy et al., 1990], also 2½ Tage früher als die sympathischen Ganglien.

4.4 Bedeutung der HO-2 während der Embryogenese

Vorkommen, Verteilung und Wirkungen der Hämoxigenasen wurden im zentralen und peripheren Nervensystem adulter Tiere ausführlich untersucht. Aber über Hämoxigenasen während der Embryonalentwicklung berichten Autoren außerordentlich wenig. Mit der Entdeckung von HO-Aktivität im Klein- und Stirnhirn des Meerschweinchens während der Embryonalentwicklung wurde über die Bedeutung der Hämoxigenasen für die neuronale Entwicklung spekuliert [Cook et al., 1997]. Über die Entwicklung von Hämoxigenasen im peripheren Nervensystem ist bislang nichts bekannt.

Die neuronale Entwicklung sympathischer Ganglien beginnt ab E10 mit der Migration von Neuroblasten aus der Neuralleiste [Troy et al., 1990]. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich bereits die ersten zytoplasmatischen Strukturproteine wie das Peripherin, das zu den intermediären Neurofilamenten gehört, nachweisen [Troy et al., 1990]. Ab E14 gelingt der Nachweis von Peripherin in allen Perikarien sympathischer Ganglien [Troy et al., 1990].

HO-2 hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Migration und auf die neuronale Differenzierung, da es sowohl zu Beginn der Migration als auch in der Folgezeit, in der die Neuroblasten sich zu einem sympathischen Ganglion formieren (SCG und SG: Beginn E13.5 [Fagan et al., 1996], CSMG und IMG: Mitte E13.5 [Kaufmann et al., 1999]), nicht nachgewiesen werden konnte. Erst 2-3 Tage nach dem Zusammenschluss zu einem Ganglion setzt die HO-2 Entwicklung in den Perikarien ein: in den sensorischen Ganglien ab E14.5 und in den sympathischen Ganglien ab E15.5.

Vielmehr sind für die Migration und für die neuronale Differenzierung andere Faktoren von Bedeutung, z.B. FGF8 (fibroblast growth factor 8). FGF8 ist sowohl für die Proliferation von Neuroblasten [Heikinheimo et al., 1994], als auch für die Differenzierung in der frühen Neurogenese des zentralen Nervensystems von Bedeutung [Lee et al., 1997]. FGF8 wurde in Neuroblasten sensorischer und sympathischer Ganglien unmittelbar nach deren Migration aus der Neuralleiste (E10) nachgewiesen [Tanaka et al., 2001].

NGF (nerve growth factor) stellt einen weiteren wichtigen Faktor dar, der für die neuronale Differenzierung von Bedeutung ist. NGF ist für das Überleben sensorischer und sympathischer Neuronen essenziell [Farinas et al., 1994]. Mangel an NGF führt in NGF^{-/-} Mäusen ab E17.5 zu einem kompletten Verlust des SCG durch Apoptose [Crowley et al., 1994]. In den Perikarien des SCG konnten TH, NGF und der Tyrosinkinase Rezeptor A (TrkA) immunhistochemisch nachgewiesen werden (E13.5). Die TH-Aktivität steigt um das 100fache (-E19), die des NGF um das 8fache (E13-E15) [Coughlin et al., 1977] und die TrkA-Aktivität mehr als das 6-fache an (E14-E15) [Wyatt et al., 1995]. Auch TrkA ist für eine normale Ganglienentwicklung essenziell, da bei TrkA^{-/-} Mäusen der Rezeptorenverlust zum Zelltod aller Ganglienzellen bis zum 9. postnatalen Tag führt [Fagan et al., 1996].

NGF und TrkA konnten auch in Perikarien von DRG (E12.5) nachgewiesen werden [Elkabes et al., 1994].

HO-2 hat keinen erkennbaren Einfluss auf das axonale Wachstum und auf die Synaptogenese, denn wie oben beschrieben beginnt ab E15.5 die HO-2 Entwicklung in einzelnen Perikarien der untersuchten sympathischen Ganglien und erst ab E18.5 nimmt diese sprunghaft zu. HO-2 konnte in Axonen weder während der Neurogenese, noch im adulten Stadium nachgewiesen werden. Darüber hinaus sind das axonale Wachstum und somit die Innervation der Zielorgane zu dem Beginn der HO-2 Entwicklung (E15.5) bereits weit fortgeschritten. Bündel sympathischer Nervenfasern, die in ihre Erfolgsorgane, z.B. Gl. submandibularis (SCG), Herz (SG), Magen und Dünndarm (CSMG) und distales Kolon (IMG) [Glebova et al., 2004], projizieren, lassen sich mit anti-TH nachweisen (E16.5): Im Zusammenhang mit dem axonalen Wachstum stellt NGF wiederum einen wichtigen Faktor dar. NGF stimuliert das Wachstum sympathischer und sensorischer Nervenfasern [Albers et al., 1994]. Die Nervenfasern erreichen ihre Zielorgane durch die chemotaktische Wirkung dieses Faktors [Gundersen et al., 1979]. NGF konnte in den Perikarien des SCG ab E13.5 nachgewiesen werden [Coughlin et al., 1977]. NGF ist nicht nur für das axonale Wachstum essenziell, sondern auch für das Überleben der neugebildeten Nervenfasern. NGF Mangel führt zu einem signifikanten Rückgang sympathischer Nervenfasern in den Erfolgsorganen von NGF^{-/-} Mäusen im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp [Glebova et al., 2004].

Weitere Faktoren, die das axonale Wachstum beeinflussen, sind der glial cell (line)-derived neurotrophic factor (GDNF) und Artemin, das ebenso zu der GDNF Familie gehört. GDNF bindet an den GFR α 1-Rezeptor [Klein et al., 1997], beeinflusst die Migration von Neuroblasten durch seine chemotaktische Wirkung und stimuliert das Wachstum von Nervenfasern [Yan et al., 2003]. Ab E15.5 wurde GDNF in 75% der Nervenfasern des SCG nachgewiesen [Yan et al., 2003]. Artemin bindet an den GFR α 3-Rezeptor [Baloh et al., 1998]. Die Wirkung von Artemin ist stadiumabhängig. Im Vergleich zum Wildtyp konnte in GFR α 3^{-/-} Mäusen gezeigt werden, dass Artemin zwischen E12-14 die Proliferation von Neuroblasten in vitro stimuliert und protektive Wirkung entfaltet [Andres et al., 2001]. Ab E15.5 konnte Artemin in 70% der Nervenfasern des SCG nachgewiesen werden [Yan et al., 2003]. Zwischen E16 und P8 nimmt die protektive Wirkung ab, um ab P20 wieder zuzunehmen. Ab P20 wird erneut das axonale Wachstum stimuliert [Andres et al., 2001]. Ein genereller Mangel an Artemin führt bei GFR α 3^{-/-} Mäusen postnatal zum Absterben der Perikarien im SCG [Andres et al., 2001].

Nochmals zusammenfassend kann festgehalten werden: HO-2 hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Migration der sympathischen Neuroblasten aus der Neuralleiste ab E10.

HO-2 hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Bildung der sympathischen Ganglien ab E13.5. Ebenso ist davon auszugehen, dass HO-2 keinen erkennbaren Einfluss auf das Wachstum sympathischer Nervenfasern besitzt, die in die Erfolgsorgane der jeweiligen Ganglien projizieren, da HO-2 zu den oben genannten Zeitpunkten in den Neuronen noch nicht nachgewiesen werden kann. Für die neuronale Entwicklung sympathischer Ganglien sind vielmehr Faktoren wie FGF8, NGF, TrkA, GDNF und Artemin verantwortlich. Darüber hinaus konnte HO-2 in Axonen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nachgewiesen werden, weder während der Neurogenese, noch im adulten Stadium. Somit kann angenommen werden, dass HO-2 in den sympathischen Ganglien während der embryonalen Entwicklung vor allem metabolische Funktionen wahrnimmt, am naheliegendsten die Degradation von Häm.

Unmittelbar nach dem Eintreffen sympathischer Nervenfasern in den Zielorganen - Bündel sympathischer Nervenfasern, die in ihre Erfolgsorganen projizieren, lassen sich mit anti-TH nachweisen (E16.5) [Glebova et al., 2004] - beginnt in den dazu gehörigen Ganglien die HO-2 Proteinbiosynthese, die zwischen E18.5 und E19.5 sprunghaft zunimmt. Die HO-2 Proteinbiosynthese hat vor Geburt ihren höchsten Level noch nicht erreicht, sondern nimmt postnatal weiter zu, so wie auch postnatal die Bildung von Nervenfasern unter dem Stimulus von NGF und Artemin und somit auch die Synaptogenese sich weiter fortsetzen [Andres et al., 2001]. Daher kann angenommen werden, dass einerseits HO-2 in den sympathischen Ganglien während der embryonalen Entwicklung metabolische Aufgaben wahrnimmt, andererseits HO-2 ein Marker neuronaler Reife darstellen könnte. Dazu passt die Beobachtung von Sun et al. [1990], dass die HO-2 Proteinbiosynthese im zentralen Nervensystem sich ebenso postnatal weiter fortsetzt.

Ein ähnlicher Sachverhalt konnte im enterischen Nervensystem beobachtet werden. Die Entwicklung enterischer Ganglienzellen beginnt zwischen E9.5-E10 mit der Migration von Neuroblasten aus der Neuralleiste in Richtung des Gastrointestinaltraktes [Young et al., 2000]. Die Neuroblasten formieren sich zum Plexus myentericus in den kranialen Abschnitten des Darmes ab E12 und im distalen Rektum bis E14.5 [Kapur et al., 1992]. HO-2 hat wiederum keinen Einfluss auf die Migration und die Bildung der Plexus myentericus, da es bei den durchgeführten Untersuchungen erst einen Tag vor Geburt (E19.5) mit einer schwachen und unmittelbar vor Geburt (E20.5) mit einer deutlichen Immunreaktion in den Ganglienzellen des Plexus myentericus beobachtet werden konnte. Dagegen lassen sich die neurotrophischen Faktoren NGF [Rawdon, 1991] und GDNF [Young et al., 2001], die auch das Wachstum von Nervenfasern enterischer Ganglienzellen stimulieren [Yan et al., 2003], unmittelbar nach Beginn der Migration aus der Neuralleiste in den enterischen Neu-

roblasten nachweisen (E11). Bereits frühzeitig konnten weitere Neuroenzyme und Neuropeptide in den enterischen Neuroblasten nachgewiesen werden, z.B. wandern NOS positive Zellen aus dem dorsalen Mesogastrium in den Plexus myentericus ein (E12) [Branchek et al., 1989]. NPY (Neuropeptid Y) und VIP (Vasoactive intestinal polypeptide) lassen sich zu Beginn der Migration (E10) in einigen myenterischen Neuroblasten nachweisen. Die Intensität der Immunreaktion beider Neuropeptide nimmt bis E15 deutlich zu, um dann wieder abzufallen [Pham et al., 1991]. NPY bewirkt einerseits über eine Bindung an den Y_1 -Rezeptor von Blutgefäßen eine Vasokonstriktion [Lundberg et al., 1990], andererseits stimuliert NPY über eine Bindung an den Y_2 -Rezeptor die Angiogenese, das Wachstum und die Migration von Endothelzellen sowie die Bildung von Kapillaren [Zukowska-Grojec et al., 1998]. VIP bewirkt eine Vasodilatation [Lundberg et al., 1982] und steigert die TH mRNA Synthese [Zurn et al., 1993].

Daher kann angenommen werden, dass HO-2 auch im enterischen Nervensystem überwiegend metabolische Aufgaben wahrnimmt und einen Marker neuronaler Reife darstellen könnte.

4.5 HO-1 in sympathischen Ganglien

Über das Vorkommen der HO-1 im adulten peripheren Nervensystem existieren in der Literatur widersprüchliche Angaben. Zakhary et al. [1996] konnten HO-1 weder in den Perikarien des Ggl. petrosus, noch in denen des SCG der Ratte nachweisen. Magnusson et al. [2000] wiesen HO-1 in sensorischen und parasympathischen Ganglien der Ratte nur mit schwacher Intensität immunhistochemisch nach. Nach Verletzung konnte eine HO-1 Induktion beobachtet werden, die zur neuronalen Regeneration als notwendig erachtet wurde.

Dies ist die erste Untersuchung, die HO-1 in den para- und prävertebralen sympathischen Ganglien während der embryonalen Entwicklung nachzuweisen versuchte. Jedoch konnte zu keinem untersuchten Zeitpunkt HO-1 in den sympathischen Ganglien nachgewiesen werden. Daher kann angenommen werden, dass HO-1 keinen Einfluss auf die Migration der Neuroblasten aus der Neuralleiste (E10), auf die Bildung eines sympathischen Ganglions (E13.5), der neuronalen Differenzierung und des axonalen Wachstums hat.

Somit scheinen auch Wirkungen der HO-1, wie der Schutz vor oxidativen Stress [Le et al., 1999; Dennerly et al., 1998], die aus dem zentralen und peripheren Nervensystem her bekannt sind, während der embryonalen Entwicklung in den sympathischen Ganglien keine Rolle zu spielen.

5. Zusammenfassung

Einleitung:

Mit der Entdeckung von NO als Prototyp einer neu entdeckten Klasse gasförmiger Transmitter wurde die Möglichkeit diskutiert, ob durch Hämoxigenasen (HO) generiertes CO ebenso wie NO ein weiterer gasförmiger Transmitter sein könnte, oder ob sich es lediglich um ein Abbauprodukt handelt. Vorkommen und Wirkung von HO-2 und HO-1 im zentralen und peripheren Nervensystem adulter Tiere wurden in der Literatur ausgiebig beschrieben. Sehr wenige Autoren haben Hämoxigenasen im zentralen Nervensystem während der embryonalen Entwicklung untersucht. Im peripheren Nervensystem existieren bislang keine Untersuchungen während der embryonalen Entwicklung. An Hand einer ontogenetischen Reihenuntersuchung sollte geklärt werden, ab wann Hämoxigenasen (insbesondere HO-2) in Neuronen sympathischer Ganglien nachgewiesen werden können und welcher Einfluss der Hämoxigenasen auf die neuronale Reifung, Wachstum der Nervenfasern sowie der Synaptogenese daraus abgeleitet werden könnte.

Material und Methoden:

HO-2 und HO-1 wurden in den paravertebralen sympathischen Ganglien SCG und SG und in den prävertebralen Ganglien CSMG und IMG der Entwicklungsstadien E14.5-E20.5, von neugeborenen und adulten Mäusen immunhistochemisch untersucht. Ergänzend wurden sensorische thorakale und lumbale Spinalganglien des E15.5 und E16.5 immunhistochemisch untersucht.

Ergebnisse:

Initial (E15.5) gelang der Nachweis von HO-2 nur in einzelnen Perikarien (0-1,4%) der untersuchten sympathischen Ganglien. Zwischen E18.5 und E19.5 konnte eine sigmoide Häufigkeitszunahme HO-2 positiver Perikarien von 35,5% auf 75,4% in allen Ganglien beobachtet werden. Unmittelbar vor Geburt (E20.5) waren bis zu 81,4%, unmittelbar nach der Geburt 92,8% und im adulten Stadium bis zu 95,1% HO-2 positiv. Zwischen den paravertebralen und den prävertebralen Ganglien gab es keine kraniokaudalen Entwicklungsunterschiede. Die HO-2 Immunreaktivität setzte nicht abrupt ein, sondern die Intensität nahm kontinuierlich zu. HO-2 konnte in den sensorischen Ganglien 2-3 Tage früher als in den sympathischen Ganglien nachgewiesen werden. Während am E15.5 max. in 1,4% der Perikarien der sympathischen Ganglien HO-2 nachgewiesen werden konnte, wurde in den sensorischen mit 17,9% 10mal häufiger HO-2 positive Neuronen

nachgewiesen. Am E16.5 reagierten circa doppelt soviele (30,2% vs. 13,1%) und am E18.5 drei mal soviele (100% vs. 35,5%) sensorische wie sympathische Neuronen HO-2 positiv. Der Nachweis von HO-1 in neuronalen Perikarien gelang in keinem der untersuchten Entwicklungsstadien.

Diskussion:

HO-2 hat keinen Einfluss auf die Migration der Neuroblasten aus der Neuralleiste (E10), auf die Bildung eines sympathischen Ganglions (E13.5) sowie auf das Wachstum der Nervenfasern und der Synaptogenese (E13.5-E16.5), da es zu diesen Zeitpunkten in den Neuronen noch nicht nachgewiesen werden konnte. Für die neuronale Entwicklung sind vielmehr Faktoren wie FGF8, NGF, TrkA, GDNF und Artemin verantwortlich. HO-2 konnte in Axonen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nachgewiesen werden, weder während der Neurogenese noch im adulten Stadium. HO-2 erfüllt somit überwiegend metabolische Aufgaben. Da HO-2 unmittelbar nach dem Eintreffen sympathischer Axone in den Zielorganen nachgewiesen werden kann (ab E16.5), könnte HO-2 ein Marker neuronaler Reife darstellen. HO-2 konnte in sensorischen Ganglien 2-3 Tage früher nachgewiesen werden, dem Vorsprung von 2½ Tagen zur Bildung eines Ganglions nach der Migration von Neuroblasten aus der Neuralleiste entsprechend. Da HO-1 zu keinem der untersuchten Zeitpunkte in den sympathischen Ganglien nachgewiesen werden konnte, hat HO-1 somit keinen Einfluss auf die Migration der Neuroblasten aus der Neuralleiste, auf die Bildung eines sympathischen Ganglions, die neuronale Differenzierung und das axonale Wachstum.

6. Summary

Introduction:

Since the implementation of nitric oxide as a neurotransmitter the role of carbon monoxide is still controversially discussed. In the literature the points of view vary from primary metabolic function to a further putative transmitter. Distribution and effects of heme oxygenases have been examined systematically in the central and peripheral nervous systems of adult animals. The role of heme oxygenases (HO) in embryonic development is poorly understood. The present study was aimed to determine the time point of occurrence of HO in sympathetic ganglia during development to obtain clues as to the role of HO in neuronal maturation, axonal growth and synaptogenesis.

Methods and Materials:

HO-2 and HO-1 were examined immunohistochemically in the paravertebral sympathetic superior cervical ganglia and stellate ganglia, in the prevertebral sympathetic celiac superior mesenteric ganglia and in the inferior mesenteric ganglia at the embryonic days E14.5-E20.5, postnatal and adult. In addition, sensory thoracic and lumbar dorsal root ganglia were examined immunohistochemically at E15.5 and E16.5.

Results:

Initially (E15.5), HO-2 immunoreactivity was observed only in few sympathetic neurons (0-1.4%). Between E18.5 and E19.5, the frequency of neuronal HO-2 positive perikarya sigmoidally increased from 35.5% up to 75.4% in all examined sympathetic ganglia. Prenatally (E20.5), HO-2 immunoreactivity was observed in 81.4%, after birth in 92.8% and in adults in 95.1% of the neurons. No significant developmental differences between prevertebral and paravertebral ganglia were seen. Intensity of HO-2 immunoreactivity did not occur in an on/off mechanism, in fact the intensity increased continuously. In sensory ganglia, HO-2 immunoreactivity was observed 2-3 days earlier than in the sympathetic ganglia. In sympathetic ganglia, HO-2 immunoreactivity was observed in 1.4% of the neurons at E15.5, while in sensory ganglia HO-2 immunoreactivity was found in 17.9% of the neurons (ten times more). At E16.5, we found two times more (30.2% vs. 13.1%) and at E18.5 three times more (100% vs. 35.5%) HO-2 positive neurons in sensory ganglia than in sympathetic ganglia. HO-1 was neither observed in adult nor in embryonic sympathetic ganglia.

Discussion:

HO-2 has no evident influence on migration of neuroblasts from the neuronal crest (E10), development of sympathetic ganglia (E13.5), axonal growth and synaptogenesis (E13.5-E16.5), because HO-2 immunoreactivity was not found in neurons at the respective time points during development. Instead, known factors such as FGF8, NGF, TrkA, GDNF and Artemin may govern these events. In general, HO-2 was observed only in cell bodies but not in axons. Therefore, HO-2 is likely to fulfil predominantly metabolic functions. HO-2 might be considered as a marker of neuronal maturation because the onset of neuronal HO-2 immunoreactivity coincides with the time point when sympathetic axons have reached their target organs (E16.5). In sensory ganglia, HO-2 immunoreactivity was observed 2-3 days earlier than in the sympathetic ganglia corresponding to the earlier development of sensory ganglia (2-3 days) after migration of neuroblasts from the neuronal crest.

HO-1 has no evident influence neither on migration of neuroblasts from the neuronal crest, development of a sympathetic ganglion, neuronal differentiation nor on growth of axons and synaptogenesis, because HO-1 immunoreactivity was not found at these points of time.

7. Literatur

Albers KM, Wright DE, Davis BM: Overexpression of nerve growth factor in epidermis of transgenic mice causes hypertrophy of the peripheral nervous system. **J Neurosci** 1994;14:1422-1432.

Andres R, Forgie A, Wyatt S, Chen Q, de Sauvage FJ, Davies AM: Multiple effects of artemin on sympathetic neurone generation, survival and growth. **Development** 2001;128:3685-3695.

Applegate LA, Noel A, Vile G: Two genes contribute to different extents to the heme oxygenase enzyme activity measured in cultured human skin fibroblasts and keratinocytes: implications for protection against oxidant stress. **Photochem Photobiol** 1995;61:285-291.

Archavachotikul K, Ciccone TJ, Chinoy MR, Nielsen HC, Volpe MV: Thyroid hormone affects embryonic mouse lung branching morphogenesis and cellular differentiation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2002;282:359-369.

Baek IJ, Yon JM, Lee BJ, Yun YW, Yu WJ, Hong JT, Ahn B, Kim YB, Kim DJ, Kang JK, Nam SY: Expression pattern of cytosolic glutathione peroxidase (cGPx) mRNA during mouse embryogenesis. **Anat Embryol** 2005;209:315-321.

Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, Leitner ML, Araki T, Johnson EM Jr, Milbrandt J: Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. **Neuron** 1998;21:1291-1302.

Battish R, Cao GY, Lynn RB, Chakder S, Rattan S: Heme oxygenase-2 distribution in anorectum: colocalization with neuronal nitric oxide synthase. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2000;278:148-155.

Bergeron M, Ferriero DM, Sharp FR: Developmental expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: an immunocytochemical study. **Brain Res Dev Brain Res** 1998;105:181-194.

Branchek TA, Gershon MD: Time course of expression of neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide, and NADPH diaphorase activity in neurons of the developing murine bowel and the appearance of 5-hydroxytryptamine in mucosal enterochromaffin cells. **J Comp Neurol** 1989;285:262-273.

Burnett AL, Johns DG, Kriegsfeld LJ, Klein SL, Calvin DC, Demas GE, Schramm LP, Tonegawa S, Nelson RJ, Snyder SH, Poss KD: Ejaculatory abnormalities in mice targeted disruption of the gene for heme oxygenase-2. **Nat Med** 1998;4:84-87.

Camhi SL, Alam J, Otterbein L, Sylvester SL, Choi AM: Induction of heme oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide is mediated by AP-1 activation. **Am J Respir Cell Mol Biol** 1995;13:387-398.

Canning BJ, Fischer A: Localization of heme oxygenase-2 immunoreactivity to parasympathetic ganglia of human and guinea-pig airways. **Am J Respir Cell Mol Biol** 1998;18:279-285.

Cardell LO, Lou YP, Tekeyama K, Ueki IF, Lausier J, Nadel JA: Carbon monoxide, a cyclic GMP-related messenger, involved in hypoxic bronchodilation in vivo. **Pulm Pharmacol Ther** 1998;11:309-315.

Chen K, Gunter K, Maines MD: Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. **J Neurochem** 2000;75:304-313.

Cook MN, Marks GS, Vreman HJ, Nakatsu K, Stevenson DK, Brien JF: Heme oxygenase activity and acute and chronic ethanol exposure in the hippocampus, frontal cerebral cortex, and cerebellum of the near-term fetal guinea-pig. **Alcohol** 1997;14:117-124.

Coughlin MD, Boyer DM, Black IB: Embryonic development of a mouse sympathetic ganglion in vivo and in vitro. **Proc Natl Acad Sci USA** 1977;74:3438-3442.

Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, Ling LH, MacMahon SB, Shelton DL, Levinson AD: Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. **Cell** 1994;76:1001-1011.

Dennery PA, Lee CS, Ford BS, Wenig YH, Yang G, Rodgers PA: Developmental expression of heme oxygenase in the rat lung. **Pediatr Res** 2003;53:42-47.

Dennery PA, McDonagh AF, Spitz DR, Rodgers PA, Stevenson DK: Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. **Free Radic Biol Med** 1995;19:395-404.

Dennery PA, Spitz DR, Yang G, Tatarov A, Lee CS, Shegog ML, Poss KD: Oxygen toxicity and iron accumulation in the lungs of mice lacking heme oxygenase-2. **J Clin Invest** 1998;101:1001-1011.

Ding Y, McCoubrey WK Jr., Maines MD: Interaction of heme oxygenase-2 with nitric oxide donors. Is the oxygenase an intracellular sink for NO? **Eur J Biochem** 1999;264:854-861.

Donat ME, Wong K, Staines WA, Krantis A: Heme oxygenase immunoreactive neurons in the rat intestine and their relationship to nitrergic neurons. **J Auton Nerv Syst** 1999;77: 4-12.

Dore S, Goto S, Sampei K, Blackshaw S, Hester LD, Ingi T, Sawa A, Traystman RJ, Koehler RC, Snyder SH: Heme oxygenase-2 acts to prevent neuronal death in brain cultures and following transient cerebral ischemia. **Neuroscience** 2000;99:587-592.

Elbirt KK, Bonkovsky HL: Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. **Proc Assoc Am Physicians** 1999;111:438-447.

Elbirt KK, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Bonkovsky HL: Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. **J Biol Chem** 1998;273:8922-8931.

Elkabes S, Dreyfus CF, Schaar DG, Black IB: Embryonic sensory development: local expression of neurotrophin-3 and target expression of nerve growth factor. **J Comp Neurol** 1994;341:204-213.

Ewing JF, Haber SN, Maines MD: Normal and heat induced patterns of expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: hyperthermia causes rapid induction of mRNA and protein. **J Neurochem** 1992;58:1140-1149.

Ewing JF, Maines MD: Histochemical localization of heme oxygenase-2 protein and mRNA expression in rat brain. **Brain Res Brain Res Protoc** 1997;1:165-174.

Ewing JF, Weber CM, Maines MD: Biliverdin reductase is heat resistant and coexpressed with constitutive and heat shock forms of heme oxygenase in brain. **J Neurochem** 1993;61:1015-1023.

Fagan AM, Zhang H, Landis S, Smmeyne RJ, Silos-Santiago I, Barbacid M: TrkA, but not TrkC, receptors are essential for survival of sympathetic neurons in vivo. **J Neurosci** 1996;16:6208-6218.

Farinas I, Jones KR, Backus C, Wang XY, Reichardt LF: Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. **Nature** 1994;369:658-661.

Farrera JA, Jauma A, Ribo JM, Peire MA, Parellada PP, Roques-Choua S, Bienvenue E, Seta P: The antioxidant role of bile pigments evaluated by chemical tests. **Bioorg Med Chem** 1994;2:181-185.

Farrugia G, Miller SM, Rich A, Liu X, Maines MD, Rae JL, Szurszewski JH: Distribution of heme oxygenase and effects of exogenous carbon monoxide in canine jejunum. **Am J Physiol** 1998;274:350-358.

Fischer A, Mundel P, Mayer B, Preissler U, Philippin B, Kummer W: Nitric oxide synthase in guinea-pig lower airway innervation. **Neurosci Lett** 1993;149:157-160.

Forssmann WG, Ito S, Weihe E, Aoki A, Dym M, Fawcett DW: An improved perfusion fixation method for the testis. **Anat Rec** 1977;188:307-314.

Friebe A, Schultz G, Koesling D: Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. **EMBO J** 1996;15:6863-6868.

Fukuda Y, Sassa S: Effect of interleukin-11 on the levels of mRNAs encoding heme oxygenase and haptoglobin in human HepG2 hepatoma cells. **Biochem Biophys Res Commun** 1993;193:297-302.

Gabis KK, Gildemeister OS, Pepe JA: Induction of heme oxygenase-1 in LMH cells. Comparison of LMH cells to primary cultures of chick embryo liver cells. **Biochem Biophys Acta** 1996;1290:113-120.

Gibbins IL: Vasomotor pilomotor and secretomotor neurons distinguished by size and neuropeptide content in superior cervical ganglia in mice. **J Auton Nerv Syst** 1991;34:171-184.

Gibbs L, Willis D, Morgan MJ: The identification and expression of heme oxygenase-2 alternative transcripts in the mouse. **Gene** 1998;221:171-177.

Glebova NO, Ginty DD: Heterogeneous requirement of NGF for sympathetic target innervation in vivo. **J Neurosci** 2004;24:743-751.

Godin I, Garcia-Porrero JA, Dieterlen-Lievre F, Cumano A: Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. **J Exp Med** 1999;190:43-52.

Grozdanovic Z, Goessl C: Comparative localization of heme oxygenase-2 and nitric oxide synthase in the autonomic innervation to the human ductus deferens and seminal vesicle. **J Urol** 1999;162:2156-2161.

Grozdanovic Z, Grossrau R: Expression of heme oxygenase-2 (HO-2)-like immunoreactivity in rat tissues. **Acta Histochem** 1996;98:203-214.

Grube D, Weber E: Immunoreactivities of gastrin (G-) cells. Dilution-dependent staining of G-cells by antisera and non-immune sera. **Histochemistry** 1980;65:223-237.

Gundersen RW, Barrett JN: Neuronal chemotaxis: chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor. **Science** 1979;206:1079-1080.

Hirai S, Izawa M, Osada S, Spyrou G, Ohno S: Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. **Oncogene** 1996;12:641-650.

Hirai S, Kawaguchi A, Hirasawa R, Baba M, Ohnishi T, Ohno S: MAPK-upstream protein kinase (MUK) regulates the radial migration of immature neurons in telencephalon of mouse embryo. **Development** 2002;129:4483-4495.

Hirai S, Kawaguchi A, Suenaga J, Ono M, Cui de F, Ohno S: Expression of MUK/DLK/ZPK, an activator of the JNK pathway, in the nervous systems of the developing mouse embryo. **Gene Expr Patterns** 2005;5:517-523.

Hedlund P, Ny L, Alm P, Andersson KE: Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. **J Urol** 2000;164:868-875.

Heikinheimo M, Lawshe A, Shackelford GM, Wilson DB, MacArthur CA: Fgf-8 expression in the post-gastrulation mouse suggests roles in the development of the face, limbs and central nervous system. **Mech Dev** 1994;48:129-138.

Ingi T, Cheng J, Ronnett GV: Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. **Neuron** 1996;16:835-842.

Jobling P, Gibbins IL: Electrophysiological and morphological diversity of mouse sympathetic neurons. **J Neurophysiol** 1999;82:2747-2764.

Kapur RP, Yost C, Palmiter RD: A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. **Development** 1992;116:167-175.

Katori M, Buelow R, Ke B, Ma J, Coito AJ, Iyer S, Southard D, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW: Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. **Transplantation** 2002;73:287-292.

Kaufman MH: The atlas of mouse development. Harcourt Brace & Company, Publishers. 3rd Edition 1999 **Academic Press London, GB**.

Keyse SM, Tyrrell RM: Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. **Proc Natl Acad Sci USA** 1989;86:99-103.

Klein RD, Sherman D, Ho WH, Stone D, Bennett GL, Moffat B, Vandlen R, Simmons L, Gu Q, Hongo JA, Devaux B, Poulsen K, Armanini M, Nozaki C, Asai N, Goddard A, Phillips H, Henderson CE, Takahashi M, Rosenthal A: A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. **Nature** 1997;387:717-721.

Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S: Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci USA** 1989;86:5159-5162.

Korsching S, Thoenen H: Developmental changes of nerve growth factor levels in sympathetic ganglia and their target organs. **Dev Biol** 1988;126:40-46.

Kozma F, Johnson RA, Zhang F, Yu C, Tong X, Nasjletti A: Contribution of endogenous carbon monoxide to regulation of diameter in resistance vessels. **Am J Physiol** 1999;276:1087-1094.

Kusner LL, Kim E, Kaminski HJ: Heme oxygenase-2 expression at rat neuromuscular junctions. **Neurosci Lett** 1999;273:143-146.

Le WD, Xie WJ, Appel SH: Protective role of heme oxygenase-1 in oxidative stress-induced neuronal injury. **J Neurosci Res** 1999;56:652-658.

Lee SM, Danielian PS, Fritsch B, McMahon AP: Evidence that FGF8 signalling from the midbrain-hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing midbrain. **Development** 1997;124:959-969.

Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A, Udenfired S: Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. **J Pharmacol Exp Ther** 1965;148:1-8.

Lincoln BC, Healey JF, Bonkovsky HL: Regulation of hepatic haem metabolism. Disparate mechanism of induction of haem oxygenase by drugs and metals. **Biochem J** 1988;250:189-196.

Liu N, Wang X, McCoubrey WK, Maines MD: Developmentally regulated expression of two transcripts for heme oxygenase-2 with a first exon unique to rat testis: control by corticosterone of the oxygenase protein expression. **Gene** 2000;241:175-183.

Llesuy SF, Tomaro ML: Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage. **Biochem Biophys Acta** 1994;11:9-14.

Lundberg JM, Änggard A, Fahrenkrug J: Complementary role of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and acetylcholine for cat submandibular blood flow and secretion. **Acta Physiol Scand** 1982;114:329-338.

Lundberg JM, Franco-Cereceda A, Hemsén A, Lacroix JS, Pernow J: Pharmacology of noradrenaline and neuropeptide Y (NPY)-mediated sympathetic cotransmission. **Fundam Clin Pharmacol** 1990;4:373-391.

Magnusson S, Ekström TJ, Elmer E, Kanje M, Ny L, Alm P: Heme oxygenase 1, heme oxygenase-2 and biliverdin reductase in peripheral ganglia from rat, expression and plasticity. **Neuroscience** 2000;95:821-829.

Maines MD: The heme oxygenase system and its functions in the brain. **Cell Mol Biol** 2000;46:573-585.

Maines MD: Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. **FASEB J** 1988;2:2557-2568.

Maines MD, Eke BC, Zhao X: Corticosterone promotes increased heme oxygenase-2 protein and transcript expression in the newborn rat brain. **Brain Res** 1996;722:83-94.

Maines MD, Kappas A: The degradative effects of porphyrins and heme compounds on components of the microsomal mixed function oxidase system. **J Biol Chem** 1975;250:2363-2369.

Maines MD, Kappas A: Metals as regulators of heme metabolism. **Science** 1977;198:1215-1221.

Maines MD, Trakshel GM, Kuttu RK: Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. **J Biol Chem** 1986;261:411-419.

Maines MD: The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 1997;37:517-554.

Marilena G: New physiological importance of two classic residual products: carbon monoxide and bilirubin. **Biochem Mol Med** 1997;61:136-142.

Matsuoka Y, Kitamura Y, Okazaki M, Kakimura J, Tooyama L, Kimura H, Taniguchi T: Kainic acid induction of heme oxygenase in vivo and in vitro. **Neuroscience** 1998;85:1223-1233.

McCoubrey WK, Eke B, Maines MD: Multiple transcripts encoding HO-2 in rat testis: developmental and cell specific regulation of transcripts and protein. **Biol Reprod** 1995;53:1330-1338.

McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD: Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **Eur J Biochem** 1997;247:725-732.

McLachlan EM, Llewellyn-Smith IJ: The immunohistochemical distribution of neuropeptide Y in lumbar pre- and paravertebral sympathetic ganglia of the guinea pig. **J Auton Nerv Syst** 1986;17:313-324.

Melo LG, Agrawal R, Zhang L, Rezvani M, Mangi AA, Ehsan A, Griese DP, Dell'Acqua G, Mann MJ, Oyama J, Yet SF, Layne MD, Perrella MA, Dzau VJ: Gene therapy strategy for long-term myocardial protection using adeno-associated virus-mediated delivery of heme oxygenase gene. **Circulation** 2002;105:602-607.

Miller SM, Farrugia G, Schmalz PF, Ermilov LG, Maines MD, Szurszewski JH: Heme oxygenase 2 is present in interstitial cell networks of mouse small intestine. **Gastroenterology** 1998;114:239-244.

Miller SM, Reed D, Sarr MG, Farrugia G, Szurszewski JH: Haem oxygenase in enteric nervous system of human stomach and jejunum and co-localization with nitric oxide synthase. **Neurogastroenterol Motil** 2001;13:121-131.

Mosley K, Wembridge DE, Cattell V: Heme oxygenase is induced in nephrotoxicnephritis and hemin, a stimulator of heme oxygenase synthesis, ameliorates disease. **Kidney Int** 1998;53:672-678.

Neuzil J, Stocker R: Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. **FEBS Lett** 1993;331:281-284.

Ny L, Alm P, Ekström P, Larsson B, Grundemar L, Andersson KE: Localization and activity of haem oxygenase and functional effects of carbon monoxide in the feline lower oesophageal sphincter. **Br J Pharmacol** 1996;118:392-399.

Ny L, Alm P, Larsson B, Andersson KE: Morphological relations between haem oxygenases, NO-synthase and VIP in the canine and feline gastrointestinal tracts. **J Auton Nerv Syst** 1997;65:49-56.

Ny L, Grundemar L, Larsson B, Alm P, Ekström P, Andersson KE: Carbon monoxide as a putative messenger molecule in the feline lower oesophageal sphincter of the cat. **Neuroreport** 1995;6:1389-1393.

Oberbaumer I, Moser D, Bachmann S: Nitric oxide synthase 1 mRNA: tissue-specific variants from rat with alternative first exons. **Biol Chem** 1998;379:913-919.

Overholt JL, Bright GR, Prabhakar NR: Carbon monoxide and carotid body chemorezeption. **Adv Exp Biol Med** 1996;410:341-344.

Panahian N, Yoshiura N, Maines MD: Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. **J Neurochem** 1999;72:1187-1203.

Pham TD, Gershon MD, Rothman TP: Time of origin of neurons in the murine enteric nervous system: sequence in relation to phenotype. **J Comp Neurol** 1991;314:789-798.

Porcher C, Orsoni P, Berdah S, Monges G, Mazet B: Distribution of heme oxygenase 2 in nerves and c-kit(+) interstitial cells in human stomach. **Histochem Cell Biol** 1999;112:317-322.

Prabhakar NR: NO and CO as second messengers in oxygen sensing in the carotid body. **Respir Physiol** 1999;115:161-168.

Prabhakar NR, Dinerman JL, Agani FH, Snyder SH: Carbon monoxide: a role in carotid body chemoreception. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1995;92:1994-1997.

Prabhakar NR, Kumar GK, Chang CH, Agani FH, Haxhiu MA: Nitric oxide in the sensory function of the carotid body. **Brain Res** 1993;625:16-22.

Raju VS, Imai N, Liang CS: Chamber-specific regulation of heme oxygenase-1 (heat shock protein 32) in right-sided congestive heart failure. **J Mol Cell Cardiol** 1999;31:1581-1589.

Raju VS, McCoubrey WK, Maines MD: Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element. **Biochim Biophys Acta** 1997;1351:89-104.

Rawdon BB: Extension of sympathetic neurites in vitro towards explants of embryonic and neonatal mouse heart and stomach: ontogeny of neuronotrophic factors. **Brain Res Dev Brain Res** 1991;59:49-58.

Rossi A, Santoro MG: Induction by prostaglandin A1 of haem oxygenase in myoblastic cells: An effect independent of expression of the 70 kDa heat shock protein. **Biochem J** 1995;308:455-463.

Rotenberg MO, Maines MD: Characterization of a cDNA-encoding rabbit brain heme oxygenase-2 and identification of a conserved domain among mammalian heme oxygenase isoenzymes: possible heme-binding site? **Arch Biochem Biophys** 1991;290:336-344.

Schüller DJ, Wilks A, Ortiz de Montellano PR, Poulos TL: Crystal structure of human heme oxygenase-1. **Nat Struct Biol** 1999;6:860-867.

Shibahara S, Müller RM, Taguchi H: Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. **J Biol Chem** 1987;262:12889-12892.

Stefanini M, De Martino C, Zamboni L: Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature** 1967;216:173-174.

Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN: Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. **Science** 1987;235:1043-1046.

Story GM, Dicarlo SE, Rodenbaugh DW, Dluzen DE, Kucera J, Maron MB, Walro JM: Inactivation of one copy of the mouse neurotrophin-3 gene induces cardiac sympathetic deficits. **Physiol Genomics** 2000;2:129-136.

Sun Y, Rotenberg MO, Maines MD: Developmental expression of heme oxygenase isozymes in rat brain. Two HO-2 mRNAs are detected. **J Biol Chem** 1990;265:8212-8217.

Tanaka A, Kamiakito T, Hakamata Y, Fujii A, Kuriki K, Fukayama M: Extensive neuronal localization and neurotrophic function of fibroblast growth factor 8 in the nervous system. **Brain Res** 2001;912:105-115.

Thorup C, Jones CL, Gross SS, Moore LC, Goligorsky MS: Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. **Am J Physiol** 1999;277:882-889.

Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD: Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. **J Biol Chem** 1986;261:11131-11137.

Troy CM, Brown K, Greene LA, Shelanski ML: Ontogeny of the neuronal intermediate filament protein, peripherin, in the mouse embryo. **Neuroscience** 1990;36:217-237.

Valaes T, Petmezaki S, Henschke C, Drummond GS, Kappas A: Control of jaundice in preterm newborns by an inhibitor of bilirubin production: studies with tin-mesoporphyrin. **Pediatrics** 1994;93:1-11.

Vollerthun R, Höhler B, Kummer W: Guinea-pig sympathetic postganglionic neurones contain haem oxygenase-2. **NeuroReport** 1995;7:173-176.

Vollerthun R, Höhler B, Kummer W: Heme oxygenase-2 in primary afferent neurons of the guinea-pig. **Histochem Cell Biol** 1996;105:453-458.

Wang L, Lee TS, Lee FY: Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. **Am J Pathol** 1998;152:711-720.

Watanabe S, Akagi R, Mori M, Tsuchiya T, Sassa S: Marked developmental changes in heme oxygenase-1 (HO-1) expression in the mouse placenta: correlation between HO-1 expression and placental development. **Placenta** 2004;25:387-395.

Watanabe T, Hasegawa G, Yamamoto T, Hatakeyama K, Suematsu M, Naito M: Expression of heme oxygenase-1 in rat ontogeny. **Arch Histol Cytol** 2003;66:155-162.

Werkström V, Ny L, Persson K, Andersson KE: Carbon monoxide-induced relaxation and distribution of haem oxygenase isoenzymes in the pig urethra and lower oesophagogastric junction. **Br J Pharmacol** 1997;120:312-318.

Wyatt S, Davies AM: Regulation of nerve growth factor receptor gene expression in sympathetic neurons during development. **J Cell Biol** 1995;130:1435-1446.

Yan H, Newgreen DF, Young HM: Developmental changes in neurite outgrowth responses of dorsal root and sympathetic ganglia to GDNF, neurturin, and artemin. **Dev Dyn** 2003;227:395-401.

Yet SF, Tian R, Layne MD, Wang ZY, Maemura K, Solovyva M, Ith B, Melo LG, Zhang L, Ingwall JS, Dzau VJ, Lee ME, Perrella MA: Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. **Circ Res** 2001;89:168-173.

Young HM, Hearn CJ, Farlie PG, Canty AJ, Thomas PQ, Newgreen DF: GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells. **Dev Biol** 2001;229:503-516.

Young HM, Hearn CJ, Newgreen DF: Embryology and development of the enteric nervous system. **Gut** 2000;47:12-14.

Zakhary R, Gaine SP, Dinerman JL, Ruat M, Flavahan NA, Snyder SH: Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996 23;93:795-798.

Zakhary R, Poss KD, Jaffrey SR, Ferris CD, Tonegawa S, Snyder SH: Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997;94:14848-14853.

Zhang L, Guarente L: Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. **EMBO J** 1995;14:313-320.

Zou AP, Billington H, Su N, Cowley AW Jr: Expression and actions of heme oxygenase in the renal medulla of rats. **Hypertension** 2000;35:342-347.

Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk E, Rose W, Rone J, Movafagh S, Ji H, Yeh Y, Chen WT, Kleinman HK, Grouzmann E, Grant DS: Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. **Circ Res** 1998;83:187-195.

Zurn AD, Fauquet M, Shaw P, Kocher J: The neuropeptide VIP regulates the expression of the tyrosine hydroxylase gene in cultured avian sympathetic neurons. **Brain Res Mol Brain Res** 1993;20:125-129.

8. Lebenslauf

Geburtsdatum: 11.8.1971 in Frankfurt a.M.

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: verheiratet mit Jana Henzel, geb. Hofmann

Schulbildung

1978-1982 Erich Kästner Grundschule Rosbach-Rodheim v.d. Höhe

1982-1991 Augustiner Schule Friedberg/Hessen, Gymnasium

Ausbildung und Studium

1991-1992 Zivildienst und Ausbildung zum Krankenpflegerhelfer,
William Harvey Klinik, Bad Nauheim

1992-1993 Anstellung als Krankenpflegerhelfer, William Harvey Klinik, Bad Nauheim

1993-1999 Medizinstudium an der Justus-Liebig-Universität Gießen

11/1999 Zeugnis über die Ärztliche Prüfung (Note: 2,83)

Beruflicher Werdegang

01/00-06/00 Arzt im Praktikum,
Abt. für Kardiologie der Deutschen Klinik für Diagnostik, Wiesbaden

07/00-06/01 Arzt im Praktikum,
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie,
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

seit 7/01 Wissenschaftlicher Assistent,
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie,
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Kummer und Herrn Dr. R. Vollerthun danke ich sehr für die Überlassung des Themas und die stets engagierte und hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit.

Für die freundliche Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Insbesondere möchte ich mich bedanken bei Herrn Martin Bodenbenner, Frau Tamara Fischbach, und Frau Karola Michael für deren freundliche Unterstützung.

Mein Dank gilt vor allem meinen Eltern und meiner lieben Frau Jana für deren Verständnis und Geduld.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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“

Gießen, den 11.8.2006