Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. E. Weihe
Abteilung für Molekulare Neurowissenschaften
Leiter: Prof. Dr. E. Weihe

Chemische Kodierung der Neurotransmission in den kranialen parasympathischen Ganglien der Ratte während der Ontogenese

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christian Brett
aus Freiburg im Breisgau

Marburg, 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am
Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: Prof. Dr. E. Weihe
Korreferent: Prof. Dr. Hemmer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 3

1. Einleitung 6

1.1 Chemische Kodierung der Neurotransmission 6

1.1.1 Vesikuläre Transportproteine 6

1.1.1.1 Vesikulärer Acetylcholintransporter (VAChT) 6

1.1.1.2 Vesikuläre Monoamintransporter (VMAT) 6

1.1.1.3 Vesikuläre Glutamattransporter (VGLUT) 7

1.1.2 Biogene Enzyme 7

1.1.2.1 Tyrosin-Hydroxylase (TH) 7

1.1.2.2 L-aromatische Aminosäure-Decarboxylase (AADC) 7

1.1.2.3 Dopamin-ß-Hydroxylase (DBH) 8

1.1.2.4 Phenylethanolamin-N-Methyltransferase (PNMT) 8

1.1.2.5 Tryptophan-Hydroxylase (TpH) 8

1.1.2.6 Histidin-Decarboxylase (HDC) 8

1.1.3 Neuropeptide und Chromogranin A 10

1.1.3.1 Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) 10

1.1.3.2 Neuropeptid Y (NPY) 10

1.1.3.3 Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) 10

1.1.3.4 Substanz P (SP) 11

1.1.3.5 Met^5-Enkephalin-Arg^6-Gly^7-Leu^8 (MERGL) 11

1.1.3.6 Chromogranin A (CgA) 12

1.2 Anatomie und chemische Kodierung der kranialen parasympathischen Ganglien der Ratte 13

1.2.1 Übersicht 13

1.2.2 Ganglion oticum 14

1.2.2.1 Anatomische Lage 14

1.2.2.2 Neuronale Phänotypen und Funktion 14

1.2.3 Ganglion sphenopalatinum 16

1.2.3.1 Anatomische Lage ... 16
1.2.3.2 Neuronale Phänotypen und Funktion ... 16
1.2.4 Ganglion submandibulare ... 19
1.2.4.1 Anatomische Lage ... 19
1.2.4.2 Neuronale Phänotypen und Funktion ... 19
1.2.5 Ganglion ciliare ... 20
1.2.5.1 Anatomische Lage ... 20
1.2.5.2 Neuronale Phänotypen und Funktion ... 21
1.2.5 Small Intensely Fluorescent Cells (SIF Zellen) ... 22
2. Fragestellung und Zielsetzung ... 24
3. Material und Methoden ... 25
3.1 Material ... 26
3.1.1 Versuchstiere ... 26
3.1.2 Chemikalien, Enzyme, Kits ... 26
3.1.3 Verbrauchsmaterial und wiederverwendbare Materialien ... 27
3.1.4 Geräte ... 28
3.2 Gewebepräparation und Fixierung ... 28
3.2.1 Haltung und Tötung der Versuchstiere ... 28
3.2.2 Präparation des Gewebes ... 29
3.2.3 Fixierung des Gewebes ... 30
3.3 Morphologische Aufbereitung ... 30
3.3.1 Silanisieren der Objektträger ... 31
3.3.2 Anfertigen histologischer Schnitte am Rotationsmikroskop ... 31
3.3.3 Anfertigen histologischer Übersichtsfärbungen ... 31
3.4 Immunhistochemie ... 32
3.4.1 Antikörper und Detektionssysteme ... 33
3.4.2 DAB/Nickel verstärkte Immunhistochemie ... 34
3.4.3 Doppelfluoreszenz-Immunhistochemie ... 38
3.5 Quantitative Auswertung und Fotodokumentation ... 38
4. Ergebnisse ... 39
4.1 Ganglion oticum ... 39
4.1.1 Vesikuläre Transportproteine ... 39
4.1.2 Biogene Enzyme ... 40

4.1.3 Neuropeptide und Chromogranin A 42
4.2 Ganglion sphenopalatinum 50
4.2.1 Vesikuläre Transportproteine 50
4.2.2 Biogene Enzyme 51
4.2.3 Neuropeptide und Chromogranin A 54
4.3 Ganglion submandibulare 62
4.3.1 Vesikuläre Transportproteine 62
4.3.2 Biogene Enzyme 63
4.3.3 Neuropeptide und Chromogranin A 65
4.4 Ganglion ciliare 73
4.4.1 Vesikuläre Transportproteine 73
4.4.2 Biogene Enzyme 74
4.4.3 Neuropeptide und Chromogranin A 76
4.4.4 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse 84
4.5 Small Intensely Fluorescent Cells (SIF Zellen) 85
5. Diskussion 87
5.1 Bedeutung der differentiellen Expression des Vesikulären Acetylcholintransporters und des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids 87
5.2 Bedeutung der Expression des vesikulären Monoamintransporters 89
5.3 Bedeutung der differentiellen Expression der Enzyme für biogene Amine 91
5.4 Bedeutung der differentiellen Peptidkodierung 99
5.5 Small Intensely Fluorescent Cells (SIF Zellen) 105
6. Zusammenfassung 106
7. Literatur 108
8. Anhang 130
8.1 Abkürzungen 130
8.2 Tabellarischer Lebenslauf 132
8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer 134
8.4 Danksagung 135

1. Einleitung

1.1 Chemische Kodierung der Neurotransmission

1.1.1 Vesikuläre Transportproteine

1.1.1.1 Vesikulärer Acetylcholintransporter (VAChT)

Der Neurotransmitter Acetylcholin wird im Zyotplasma aus Cholin und AcetylCoenzym A durch das Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT) synthetisiert. ChAT gilt als traditioneller Marker für cholinerge Neurone [176]. Der vesikuläre Acetylcholintransporter (VAChT) ist ein H^+-abhängiger Transporter in der Vesikelmembran mit 12 transmembranösen Domänen, der Acetylcholin in die präsynaptischen Vesikel verpackt. Er befindet sich auf dem gleichen Genlocus wie ChAT [52]. VAChT konnte kloniert und funktionell getestet werden und somit als zuverlässiger Marker für cholinerge Neurone im zentralen und peripheren Nervensystem etabliert werden [165, 236, 177, 178, 7].

1.1.1.2 Vesikuläre Monoamintransporter (VMAT)

Vesikuläre Monoamintransporter (VMAT) vermitteln ATP-abhängig die Konzentration von Monoaminen in sekretorischen Vesikeln [50, 51, 53, 54, 120, 155]. Es konnten zwei Isoformen der vesikulären Monoamintransporter (VMAT-1 und VMAT-2) kloniert und pharmakologisch charakterisiert werden [50, 54, 90, 120]. Diese beiden Isoformen zeigen eine zellspezifische Verteilung: Während VMAT-1 im zentralen Nervensystem, postganglionären Neuronen des sympathischen Nervensystems, den EC-Zellen des Darms, chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks, endokrinen Zellen und SIF-Zellen nachgewiesen wurde [54, 156, 180, 235], zeigte sich VMAT-2-Expression in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems, in ECL-Zellen des Magens, in chromaffinen

Granula des Nebennierenmarks, in Lagerhans-Zellen, in Mastzellen und in SIF Zellen [54, 156, 180, 235, 237]. VMAT-2 transportiert Katecholamine, Indolamine und Histamin in die Vesikel und ist in sämtlichen bisher untersuchten katecholaminergen, serotoninergen und histaminergen Neuronen enthalten. Diese Tatsache macht VMAT-2 zu einem exzellenten Marker für solche Neurone und Fasern im peripheren Nervensystem [90, 236].

1.1.1.3 Vesikuläre Glutamattransporter (VGLUT)

Vesikuläre Glutamattransporter (VGLUT) vermitteln protonenabhängig den Transport von Glutamat, dem vornehmlichen Neurotransmitter in exzitatorischen Neuronen von Säugetieren, in die synaptischen Vesikel [179]. Es wurden bisher drei Isotypen des vesikulären Glutamattransporters (VGLUT-1-3) beschrieben und durch eine Reihe biochemischer, elektrophysiologischer und genetischer Testverfahren als zuverlässige Markerproteine für glutamaterge Neurone etabliert [65, 59, 211, 229].

1.1.2 Biogene Enzyme

1.1.2.1 Tyrosin-Hydroxylase (TH)

Die Tyrosin-Hydroxylase (TH), eine Oxidase, katalysiert in der Katecholaminbiosynthese die Reaktion von Tyrosin + O_2 zu L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA). TH limitiert die Syntheserate für Dopamin und Noradrenalin, sowie Adrenalin und kommt in allen katecholaminproduzierenden Zellen vor [101].

1.1.2.2 L-aromatische Aminosäure-Decarboxylase (AADC)

Die L-aromatische Aminosäure-Decarboxylase (AADC; auch: L-Dopa-Decarboxylase) wandelt L-DOPA zu Dopamin und CO_2 um. Interessanterweise ist dieses Enzym identisch mit der 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase, die den zweiten Schritt der Serotoninbiosynthese, die Umwandlung von 5-Hydroxytryptophan zu 5-Hydroxytryptamin (Serotonin), katalysiert [101]. Damit ist

dieses Enzym nicht spezifisch für ein bestimmtes biogenes Amin , sondern ist obligat für serotoninerge und katecholaminerge Neurone.

1.1.2.3 Dopamin-ß-Hydroxylase (DBH)

Die Dopamin-ß-Hydroxylase (DBH) ist das dritte Enzym in der Reaktionskette der Katecholaminbiosynthese und wandelt Dopamin zu Noradrenalin um [101].

1.1.2.4 Phenylethanolamin-N-Methyltransferase (PNMT)

Die Phenylethanolamin-*N*-Methyltransferase (PNMT) ist das Enzym, das den letzten Schritt der Adrenalinsynthese katalysiert und Noradrenalin zu Adrenalin umwandelt [101].

1.1.2.5 Tryptophan-Hydroxylase (TpH)

Die Tryptophan-Hydroxylase (TpH) ist eine der Tyrosin-Hydroxylase ähnliche Oxidase und das ratenlimitierende Enzym für die Serotoninbiosynthese. TpH wandelt Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan um und ist spezifisch für serotoninerge Neurone [101].

1.1.2.6 Histidin-Decarboxylase (HDC)

Die Histidin-Decarboxylase (HDC) ist das einzige Enzym in der Histaminsynthese. HDC wandelt Histidin zu Histamin um [101].

Die nachfolgende Tabelle 1.1 soll einen zusammenfassenden Überblick über die klassischen Transmittersysteme mit den jeweiligen vesikulären Transportproteinen und Enzymen geben. Abbildung 1.1 skizziert die Synthesewege von Adrenalin, Serotonin und Histamin.

Transmittersystem	**biogenes Enzym**	**vesukulärer Transporter**
cholinerg	ChAT	VAChT
dopaminerg	TH, AADC	VMAT-2
noradrenerg	TH, AADC, DBH	VMAT-2
adrenerg	TH, AADC, DBH, PNMT	VMAT-2
serotoninerg	TpH, 5-HTD (identisch mit AADC)	SERT, VMAT-2
histaminerg	HDC	VMAT-2
glutamaterg	(allgemeiner Stoffwechsel)	VGLUT-1-3

Tabelle 1.1: Kodierung der verschiedenen klassischen Transmittersysteme durch Transportproteine und biogene Enzyme

Abkürzungen:, *ChAT* = Cholin-Acetyltransferase, *TH* = Tyrosin-Hydroxylase, *AADC* = L-aromatische Aminosäure-Decarboxylase, *DBH* = Dopamin-ß-Hydroxylase, *PNMT* = Phenylethanolamin-*N*-Methyltransferase, *TpH* = Tryptophan-Hydroxylase, *5-HTD* = 5-Hydroxytryptamin-Decarboxylase, *HDC* = Histidin-Decarboxylase, *SERT* = Serotonin-Membrantransporter, *VAChT* = vesikulärer Acetylcholintransporter, *VMAT* = vesikulärer Monoamintransporter, *VGLUT* = vesikulärer Glutamattransporter

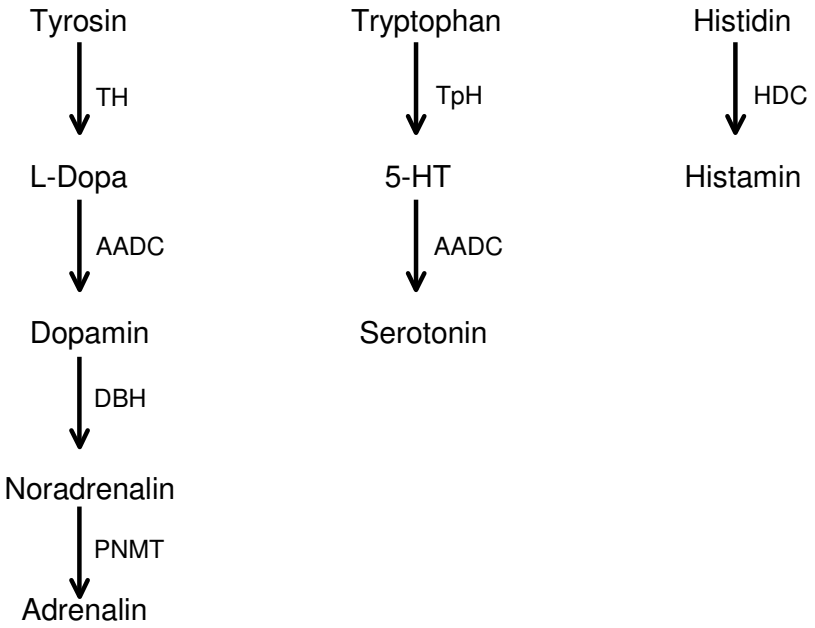

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Synthesewege der biogenen Amintransmitter mit ihren jeweiligen Enzymen. Abkürzungen siehe Legende Tabelle 1.1.

1.1.3 Neuropeptide und Chromogranin A

1.1.3.1 Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP)

Das Vasoaktive Intestinale Polypeptid (VIP), ein 28 Aminosäuren langes Peptid wurde ursprünglich aus dem Darm des Schweins isoliert [140, 171] und ist ein wichtiger Kotransmitter von Acetylcholin in parasympathischen Neuronen [121a]. Die beiden Hauptwirkungen von VIP sind die Vasodilatation [3, 71, 127] und die Stimulation seromuköser Drüsen [46, 61, 123, 154]. VIP ist an der Innervation der zerebralen Blutgefässe massgeblich beteilgt [36, 38, 204] und soll darüberhinaus eine wichtige Rolle in der Entstehung des Kopfschmerzes spielen [39, 40, 41]. Desweiteren fördert VIP indirekt das Neuritenwachstum über die Ausschüttung von neurotrophen Faktoren, wie dem Activity-Dependent Neurotrophic Factor (ADNF) [239], sowie die Stimulation der CgA-Ausschüttung in der Glandula submandibularis [243].

1.1.3.2 Neuropeptid Y (NPY)

Neuropeptid Y (NPY) ist ein Peptid mit einer Länge von 36 Aminosäuren und wurde ursprünglich aus dem Gehirn von Schweinen isoliert [213, 214]. NPY wurde in peripheren Neuronen als noradrenerger Kotransmitter mit vasokonstriktorischer Wirkung beschrieben [60, 88, 97, 124, 125, 245]. NPY kommt unter anderem in perivaskulären Nervenfasern vor, wo es mit Noradrenalin koexistiert [45], ausserdem in sympathischen Fasern in der nasalen Mukosa [12] und in Varikositäten an Acini, Ausführungsgängen und Gefässen in der Glandula submandibularis, wo es mit SP und VIP koexistiert [98].

1.1.3.3 Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)

Das Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) ist ein 37 Aminosäuren langes Neuropeptid, das sich vom Calcitonin Gen ableitet [167]. CGRP wurde 1982 bei der Untersuchung des primären Transkripts des Calcitonin-Gens der Ratte entdeckt [4]. Es ist ein starker Vasodilatator [19a] und vor allem in sensiblen Neuronen mit SP kolokalisiert [76]. CGRP wird durch die Beteiligung an der Innervation der intrakraniellen Gefässe eine Bedeutung bei der Entstehung des

Kopfschmerzes [38, 40, 41, 170, 223], sowie bei der Nozizeption in der nasalen Mukosa beigemessen [12, 130]. CGRP ist in der Lage, Mastzellen zu degranulieren [157]. In frühen postnatalen Stadien (P5 – P12) ist CGRP als Sekretions-Stimulator für die Glandula submandibularis beschrieben worden [173]. Ausserdem wurde CGRP zusammen mit SP eine Rolle in der Regulierung der Salivation zugeschrieben [47, 172].

1.1.3.4 Substanz P (SP)

Substanz P (SP) ist ein 11 Aminosäuren langes Undekapeptid, gehört zur Familie der Tachykinine [80, 12] und wurde 1931 von Euler und Gaddum entdeckt [55]. SP ist insbesondere in primärafferenten C-Fasern lokalisiert [150] und befindet sich hauptsächlich in sensiblen Neuronen, wo sie in spezifischen Subpopulationen mit CGRP kolokalisiert ist [76]. Substanz P spielt eine wichtige Rolle für neuronale Funktionen, Blutdruck, Sekretion, die Aktivität der glatten Muskulatur und in der Schmerzwahrnehmung [143]. SP ist zusammen mit CGRP an der Regulierung der Salivation beteiligt [47, 172]. Darüberhinaus spielt SP eine Rolle bei der allergischen Reaktion der Nasenschleimhaut [244]. Zusätzlich wurde ein Einfluss von SP auf die Histaminfreisetzung aus den Mastzellen postuliert [233, 234].

1.1.3.5 Met^5-Enkephalin-Arg^6-Gly^7-Leu^8 (MERGL)

Die Opioide werden aus den drei Vorläufern Proenkephalin, Prodynorphin und Proopiomelanocortin gebildet, die jeweils von einem anderen Gen abstammen [101]. Das Opioidpeptid Met^5-Enkephalin-Arg^6-Gly^7-Leu^8 (MERGL) aus der Familie der Enkephaline ist ein Präproenkephalin A codiertes Oktapeptid und eignet sich, durch Kolokalisationsstudien mit Leu- und Met-Enkephalin gezeigt [92, 119, 158], sehr gut als Marker für enkephalinerge Neurone [108, 145, 232]. MERGL kommt in sensorischen Neuronen vor [183], ist in bestimmten Regionen in Neuronen mit VIP und NPY [108], bzw. mit Noradrenalin [107] kolokalisiert und spielt eine Rolle bei chronischem Schmerz [160].

1.1.3.6 Chromogranin A (CgA)

Chromogranin A (CgA) ist ein 70 kDa Glykoprotein, das panneuronal im sympathischen, parasympathischen, sensorischen und enterischen Nervensystem, sowie im ZNS und im Rückenmark vorkommt [175]. CgA wurde darüberhinaus in zahlreichen neuroendokrinen Zellen [56], Merkel Zellen [78] und chromaffinen Zellen [44] gefunden und fungiert unter anderem als Prohormon [215, 191], Regulator in der Sortierung sekretorischer Peptide [166] und ist obligat an der Vesikulogenese von „dense-core-Vesikeln“ beteiligt [63, 64, 89, 162, 163, 105]. Eine Depletion von CgA führt zum Verlust der Bildung von „dense-core-Vesikeln“ [104].

Im nächsten Abschnitt wird auf die anatomische Lage der kranialen parasympathischen Ganglien der Ratte, sowie deren bisher in der Literatur beschriebene Ausstattung mit vesikulären Transportproteinen, biogenen Enzymen und Neuropeptiden genauer eingegangen.

1.2 Anatomie und chemische Kodierung der kranialen parasympathischen Ganglien der Ratte

1.2.1 Übersicht

Die foldende Abbildung (Abb. 1.2) soll einen zusammenfassenden Überblick über Ursprung, zentralen und peripheren Verlauf und Verschaltung der präganglionären Fasern, sowie die wichtigen Innervationsgebiete der kranialen parasympathischen Ganglien geben.

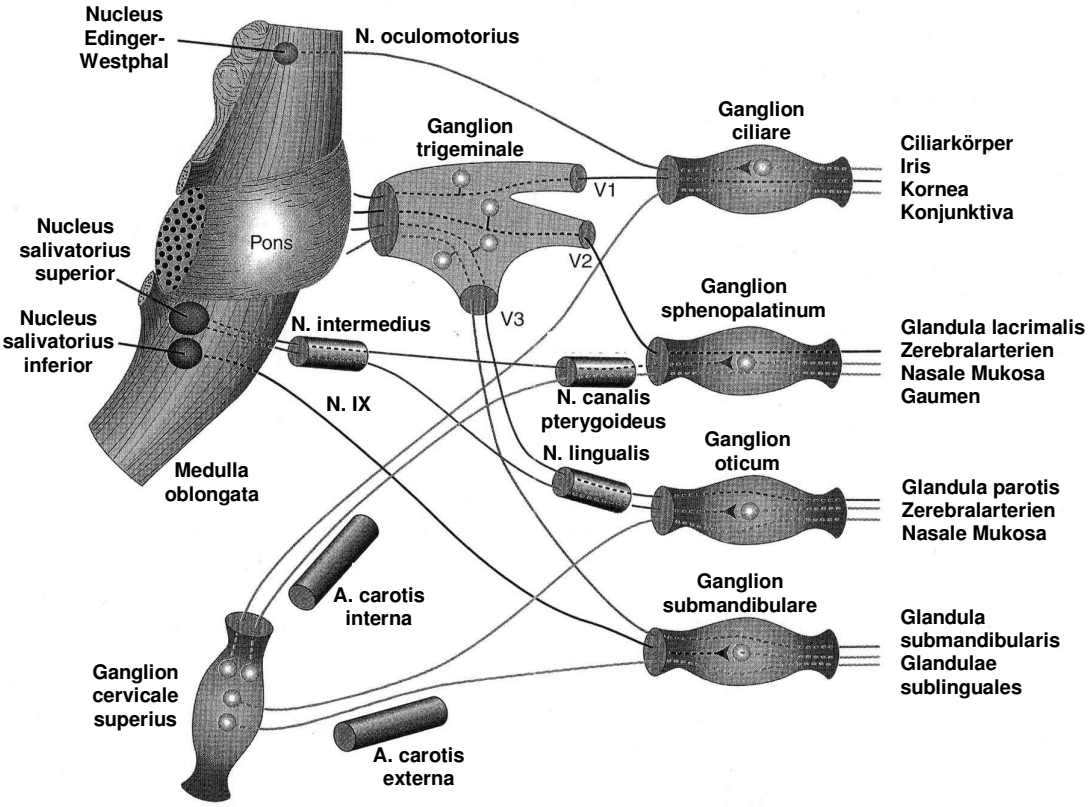

Abbildung 1.2: Schematische Übersicht über die jeweils wichtigsten Innervationsgebiete der kranialen parasympathischen Ganglien mit Ursprüngen, Verlauf und Verschaltung der sympathischen, parasympathischen und sensorischen präganglionären Fasern. N. IX = N. glossopharyngeus (Modifiziert nach Loewy und Spyer [247])

1.2.2 Ganglion oticum

1.2.2.1 Anatomische Lage

Wie auch beim Menschen befindet sich das Ganglion oticum bei der Ratte medial des Austritts des N. mandibularis unter der Schädelbasis in der Fossa infratemporalis. Es erhält seine parasympathischen Afferenzen aus dem N. petrosus minor (aus N. tympanicus, wiederum aus N. glossopharyngeus), seine sympathischen Afferenzen aus dem Nervengeflecht der A. meningea media (aus Plexus caroticus) und seine sensiblen Afferenzen aus dem N. mandibularis, die von motorischen Fasern aus demselben Nerven begleitet werden. [218]

1.2.2.2 Neuronale Phänotypen und Funktion

In den VAChT-positiven postganglionären cholinergen Neuronen des Ganglion oticum der Ratte wurde in embryonalen Entwicklungsstadien die Expression von *VMAT-2* in einer nicht quantifizierten Population der Neurone nachgewiesen. Im adulten Stadium waren keine VMAT-2-positiven postganglionären Neurone mehr im Ganglion oticum vorhanden [180].

TH konnte nur in einer minimalen Subopopulation der Neurone des Ganglion oticum der Ratte (weniger als 1%) im adulten Stadium festgestellt werden [112]. Andere Autoren verneinten die TH-Expression in den postganglionären Neuronen [76]. Eine Expression von *DBH* konnte in weniger als 5% der Neurone des Ganglion oticum der Ratte nachgewiesen werden [76].

VIP als parasympathischer Kotransmitter wurde im adulten Stadium in den meisten Neuronen des Ganglion oticum der Ratte (Prozentangaben von 80% bis 97,4%) nachgewiesen [68, 74, 76, 206]. *SP*-Immunreaktion wurde nur in einer kleinen Subpopulation (weniger als 5%) der postganglionären Neurone des Ganglion oticum der Ratte im adulten Stadium gefunden [68, 76]. Auch *CGRP* konnte nur in einer kleinen Population der Neurone des Ganglion oticum der Ratte im adulten Stadium nachgewiesen werden. Andere Autoren beschrieben schwache Reaktionen für CGRP in singulären Neuronen [6, 76, 190]. Über die Expression von *NPY* in den postganglionären Neuronen des Ganglion oticum

der Ratte gingen die Aussagen weit auseinander: Die Angaben über die Anzahl der reaktionspositiven Neurone im adulten Stadium variierten zwischen 30% und 80% [68, 76, 112, 113, 206].
Koexistenzen in den postganglionären Neuronen des Ganglion oticum der Ratte konnten für VIP/NPY/SP [68, 76], VIP/NPY [76, 112, 113, 206] und DBH/VIP/NPY [76] nachgewiesen werden.

Das Innervationsgebiet der Hauptpopulation der Neurone des Ganglion oticum der Ratte ist die Glandula parotis [21, 185, 231]. In diesen Neuronen wurden Immunreaktionen für VIP und SP, bzw. für VIP/NPY nachgewiesen. Auch in den terminalen Nervenfasern in der Glandula parotis wurde VIP und SP, bzw. VIP/NPY nachgewiesen [99, 113, 185].
Als weiteres wichtiges Innervationsgebiet der postganglionären Neurone des Ganglion oticum der Ratte wurden die zerebralen Blutgefässe, insbesondere der Circulus Arteriosus Willisii mit den davon abgehenden Arterien (v.a. A. cerebri media) genannt. In den postganglionären Neuronen für diese Gefässe wurde die Expression von VIP, bzw. VIP/NPY nachgewiesen [37, 42, 187, 204, 206].
Eine weitere Beteiligung an der vaskulären Innvervation aus den Neuronen des Ganglion oticum der Ratte wurde für die A. meningea media, die A. temporalis superficialis und die pialen Gefässe jeweils aus VIP-positiven Neuronen beschrieben 205, [222, 224].
Ein ebenfalls wichtiges Innervationsgebiet der postganglionären Neurone des Ganglion oticum der Ratte ist die nasale Mukosa, die von postganlionären Neuronen innerviert wird, in denen Immunreaktionen für VIP, VIP/NPY und VIP/SP nachgewiesen wurden [68].
Zusätzlich waren noch die Unterlippe und die temporomandibuläre Gelenkkapsel als Innervationsgebiete der Neurone des Ganglion oticum der Ratte aufgeführt [99, 225].

1.2.3 Ganglion sphenopalatinum

1.2.3.1 Anatomische Lage

Das Ganglion sphenopalatinum der Ratte befindet sich, analog der anatomischen Lage beim Menschen, in der Fossa sphenopalatina in der Nähe der Aufzweigungsstelle des N. maxillaris. Seine Afferenzen erhält es aus dem N. facialis (parasympathische Fasern über den N. petrosus major), aus dem Plexus caroticus (sympathische Fasern über den N. petrosus profundus) und aus dem N. maxillaris (sensible Fasern über Rami ganglionares). Auch hier werden nur die parasympathischen Fasern verschaltet. [218]

1.2.3.2 Neuronale Phänotypen und Funktion

In den VAChT-positiven cholinergen postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum der Ratte wurde in embryonalen Entwicklungsstadien die Expression von *VMAT-2* in einer nicht quantifizierten Population der Neurone nachgewiesen. Im adulten Stadium waren keine VMAT-2-positiven Neurone mehr vorhanden. In den Embryonalstadien war VMAT-2 mit VAChT koexprimiert [180]. *VAChT* wurde auf mRNA-Ebene in allen Neuronen des Ganglion sphenopalatinum der Ratte nachgewiesen [176].

Die *TH*-Expression in den postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum der Ratte wurde von einer Arbeitsgruppe hinsichtlich ihrer Dynamik während der Entwicklung untersucht. Hier wurden TH-positive Neurone vereinzelt ab Embryonaltag (E) 16,5 beobachtet. Zwischen E 18,5 und postnatalem Tag (P) 1 stieg die Anzahl der TH-positiven Neurone auf ca. 9% an und nahm bis zum adulten Stadium auf 1,8% wieder ab [114]. Andere Autoren detektierten im adulten Stadium weniger als 1% TH-positive Neurone [112]. TH--positive Fasern wurden bereits ab E 15,5 nachgewiesen [114]. Manche Autoren verneinten die Existenz von TH-exprimierenden Neuronen im Ganglion sphenopalatinum der Ratte im adulten Stadium [76, 138].

Die Beobachtung von TH-Immunreaktivität in einem Teil der Neurone des Ganglion sphenopalatinum der Ratte führte zu einer Untersuchung, bei der den

Tieren kurz vor ihrer Tötung die Dopaminvorstufe L-DOPA systemisch appliziert wurde. Nach anschliessender Fixation mit Glyoxylsäure zeigte sich eine starke Katecholamin-Histofluoreszenz in den postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum, was zu der Annahme einer AADC-Aktivität in diesen Neuronen führte. Nach Inkubation mit einem Noradrenalin-Analogon wurde jedoch keine Histofluoreszenz in den Neuronen beobachtet [114].

DBH wurde in weniger als 5% der postganglionären Neurone des Ganglion sphenopalatinum der Ratte beobachtet [76].

Die überwiegende Anzahl der Neurone des Ganglion sphenopalatinum der Ratte im adulten Stadium wurde als reaktionspositiv für *VIP* beschrieben [68, 74, 76, 112, 122, 128, 129, 138, 206]. Auch *CgA* konnte in den meisten postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum der Ratte im adulten Stadium nachgewiesen werden [138, 176].

SP konnte in vielen positiven Fasern, aber nur wenigen Neuronen (zwischen 1% und 5%) des Ganglion sphenopalatinum der Ratte im adulten Stadium gezeigt werden [14, 76]. Andere Autoren verneinten die Existenz von SP-positiven Neuronen im Ganglion sphenopalatinum der Ratte [117].

CGRP wurde in einer sehr kleinen Population, meist schwach positiver postganglionärer Neurone des Ganglion sphenopalatinum der Ratte im adulten Stadium gefunden [76, 117, 190]. Andere Autoren verneinten die Existenz von CGRP in den Neuronen [68]. Es wurden SP- und CGRP-positive Varikositäten und Terminalen gefunden, die synaptischen Kontakt mit den Neuronen des Ganglion sphenopalatiunum eingingen und als Axonkollateralen des Ganglion trigeminale postuliert wurden [14, 138, 208]. Die Zahlenangaben über die nachgewiesenen *NPY*-positiven Neurone im Ganglion sphenopalatinum der Ratte im adulten Stadium schwankte zwischen sehr wenigen Neuronen bis 54,1% der Neurone [68, 76, 109, 112, 138, 206].

Koexistenzen konnten für VIP/NPY (47,4%), VIP/NPY/ENK (6,6%) und VIP/ENK (3,9%) in den postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum der Ratte gezeigt werden [68, 138, 180, 206].

Katecholamine konnten in den Neuronen nicht nachgewiesen werden [114]. Es wurden viele SIF-Zellen im Ganglion sphenopalatinum beobachtet, die durch ihre starke TH-Immunreaktivität und ihre geringere Grösse im Vergleich zu den postganglionären Neuronen identifiziert werden konnten [114].

Aus den Neuronen des Ganglion sphenopalatinum der Ratte werden vor allem die Glandula lacrimalis, die nasale Mukosa und die Hirnbasisarterien innerviert.
Neben der Glandula lacrimalis, die mit VIP- und NPY-positiven Fasern innerviert wird, werden auch die Konjunktiva mit VIP/NPY-kopositiven Fasern, die Choroidea mit NPY-positiven Fasern, das periorbitale Gewebe und die Meibom´sche Drüse und der M. tarsalis des Augenlides mit VIP- und DBH-positiven Fasern aus den postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum versorgt [15, 48, 75, 113, 192].
Die Innervation der nasalen Mukosa der Ratte erfolgt über VIP-, SP- und VIP/NPY-positive Fasern aus den Neuronen des Ganglion sphenopalatinum [6, 68, 75, 116, 126, 200, 220, 221].
Die Gefässinnervation der Zerebralarterien aus den postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum der Ratte konzentriert sich vor allem auf den Circulus Arteriosus Willisii mit seinen Ästen, der A. cerebri anterior, A. cerebri media, A. cerebri posterior, sowie die A. carotis interna und teilweise die A. basilaris. In den Fasern hierfür konnte hauptsächlich VIP, aber auch NPY, bzw. VIP/NPY/ACh kolokalisiert nachgewiesen werden [19, 20, 22, 36, 37, 42, 74, 75, 135, 141, 204, 206, 207]. Weitere, teilweise aus den postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum versorgte Gefässe sind die ipsilaterale A. meningea media mit VIP-positiven Fasern, die A. ophthalmica, die A. temporalis superficialis, die pialen Gefässe, sowie der Sinus cavernosus [49, 77, 222, 224]. Damit fällt dem Ganglion sphenopalatinum eine wichtige Aufgabe bei der Regulierung des zerebralen Blutflusses zu, was experimentell durch Stimulation der Neurone des Ganglion sphenopalatinum, bzw. ihrer Fasern mit konsekutiver Steigerung des Blutflusses gezeigt werden konnte [184, 207].
Als weitere Innervationsgebiete der postganglionären Neurone des Ganglion sphenopalatinum der Ratte konnten das Ganglion ciliare durch VIP-positive Fasern und der Gaumen durch NPY-positive Fasern gezeigt werden [15, 113].
Durch Stimulation der Neurone des Ganglion sphenopalatinum konnte auch eine Erhöhung der Plasmaprotein-Extravasation um etwa 200% in der ipsilateralen Dura mater beobachtet werden, was eine Beteiligung an einer neurogenen Entzündung nahelegt, wie sie bei der Entstehung der Migräne vermutet wird [32].

1.2.4 Ganglion submandibulare

1.2.4.1 Anatomische Lage

Das Ganglion submandibulare der Ratte ist wie beim Menschen hauptsächlich im Hilusbereich der Submandibulardrüse lokalisiert, ferner in den interlobulären Septen von Glandula submandibularis und Glandulae sublinguales, meist entlang der Hauptausführungsgänge. Seine Afferenzen erhält es aus der Chorda tympani (parasympathische Fasern aus dem N. facialis über den N. lingualis aus N. mandibularis) und dem Plexus caroticus (sympathische Fasern). [218]

1.2.4.2 Neuronale Phänotypen und Funktion

In den VAChT-positiven cholinergen postganglionären Neuronen des Ganglion submandibulare der Ratte konnte in embryonalen Entwicklungsstadien die Expression von *VMAT-2* in einer nicht quantifizierten Population nachgewiesen werden. Im adulten Stadium konnten keine VMAT-2-positiven Neurone mehr nachgewiesen werden. In den Embryonalstadien war VMAT-2 mit VAChT koexprimiert [180]. *VAChT* wurde auf mRNA-Ebene in allen Neuronen des Ganglion submandibulare der Ratte nachgewiesen [176].

TH-positive Neurone wurden nur gelegentlich und in geringer Anzahl (bis ca. 4%) im adulten Stadium im Ganglion submandibulare der Ratte beobachtet [144, 186, 195, 196]. *DBH*-Immunreaktivität konnte sowohl in der Glandula submandibularis, als auch in den Neuronen des Ganglion submandibulare der Ratte im adulten Stadium nachgewiesen werden; Noradrenalin fehlte jedoch in den Neuronen [28, 69].

Eine Subpopulation von *MERGL*-positiven Neuronen wurde im Ganglion submandibulare der adulten Ratte gefunden [144, 186, 195, 196]. Die Immunreaktivität für *VIP* konnte in der Hauptpopulation der Neurone des Ganglion submandibulare der Ratte im adulten Stadium nachgewiesen werden [144, 98, 196]. *SP* wurde in einer variablen Anzahl von Neuronen im embryonalen und adulten Stadium gefunden [144]. Andere Autoren beschrieben eine Abnahme der SP-

positiven Neurone vom Embryonalstadium (92% SP-positive Neurone) bis zum Erwachsenenstadium (18% SP-positive Neurone) [230], bzw. die Existenz von SP-positiven Neuronen im adulten Stadium [9, 98]. *CGRP*-positive postganglionäre Neurone im Ganglion submandibulare der Ratte konnten nur in sehr geringer Anzahl im adulten Stadium nachgewiesen werden [144, 190]. Andere Autoren verneinten die Existenz von CGRP-positiven Neuronen im Ganglion submandibulare der Ratte [194]. *NPY*-Immunreaktivität wurde in einer variablen Anzahl von Neuronen im adulten Ganglion submandibulare der Ratte gefunden [98, 144, 181].

Koexistenzen in den Neuronen des Ganglion submandibulare der Ratte wurden für VIP/MERGL und VIP/NPY/SP nachgewiesen [98, 196].
Es wurde ebenfalls gezeigt, dass es innerhalb des Ganglion submandibulare der Ratte zwei verschiedene Population von Neuronen gibt, die sich unterscheiden lassen durch a) ihre Lokalisation innerhalb des Ganglions, b) die Innervation ihrer Zielorgane und c) das Vorkommen intrinsischer Synapsen [103].
Die Innervationsgebiete der postganglionären Neurone des Ganglion submandibulare sind die Glandula submandibularis und die Glandulae sublinguales.

1.2.5 Ganglion ciliare

1.2.5.1 Anatomische Lage

Das Ganglion ciliare befindet sich bei der Ratte, wie auch beim Menschen, in der Orbita und ist hinter dem Bulbus, dicht am Nervus opticus gelegen. Seine Afferenzen erhält es aus dem N. oculomotorius (parasympathische Fasern), aus dem cervicalen Grenzstrang (sympathische Fasern) und aus dem N. ophthalmicus (sensible Fasern über den N. nasociliaris). [218]

1.2.5.2 Neuronale Phänotypen und Funktion

In allen postganglionären Neuronen des Ganglion ciliare der Ratte konnte mRNA für *VAChT* nachgewiesen werden [176].

TH wurde im Vergleich zu den drei anderen Ganglien in einem Grossteil der Neurone des adulten Ganglion ciliare der Ratte gefunden. Zahlenangaben schwankten zwischen 25% und 75% [76, 111, 112, 219, 227]. *DBH*-Immunreaktivität wurde in ca. 10% der Neurone nachgewiesen [111]. Andere Autoren verneinten die Existenz von DBH-positiven Neuronen im adulten Ganglion ciliare der Ratte [227]. *AADC*-positive postganglionäre Neurone im Ganglion ciliare wurden bisher nur beim Huhn beobachtet [90].

Die Angaben über die Anzahl der *VIP*-positiven Neurone im adulten Ganglion ciliare der Ratte variierten von einigen wenigen bis zu 96,5% [76, 206]. *SP* konnte nur in weniger als 5% der postganglionären Neurone im adulten Ganglion ciliare der Ratte nachgewiesen werden [76]. *CGRP* wurde in einer Subpopulation von maximal 26% der Neurone des Ganglion ciliare der Ratte im adulten Stadium beobachtet, wobei die Immunreaktionen meist als relativ schwach beschrieben wurden [76, 190, 203]. *NPY* konnte ebenfalls nur in einer Subpopulation der Neurone im adulten Ganglion ciliare der Ratte gezeigt werden. Hier schwankten die Zahlenangaben zwischen 15% und 43% [76, 112, 203, 206, 219].

Koexistenzen wurden für VIP/NPY, TH/DBH und TH/NPY nachgewiesen [111, 112, 206]. Zusätzlich wurde die Existenz von von SIF Zellen innerhalb des Ganglion ciliare der Ratte beschrieben, die sich durch ihre geringere Grösse im Vergleich zu den Neuronen und ihre intensive TH-Immunreaktivität auszeichneten [111].

Von den postganglionären Neuronen des Ganglion ciliare der Ratte werden der Ciliarkörper, die Iris, die Kornea und die Konjunktiva innerviert [247].

1.2.5 Small Intensely Fluorescent Cells (SIF Zellen)

Die Small Intensely Flourescent Cells (SIF Zellen) der Ratte, Abkömmlinge der Neuralleiste [24], zeichnen sich durch eine intensive Expression von Katecholaminen aus und sind deshalb aufgrund ihrer starken TH-Immunreaktivität gut zu detektieren. Ausserdem sind sie kleiner als die postganglionären Neurone der Ganglien. Es wurden zwei Typen von SIF Zellen postuliert: Typ-1 SIF Zellen sollen als Interneurone fungieren und Typ-2 SIF Zellen als endokrine Zellen. SIF Zellen werden im allgemeinen als Bestandteile der sympathischen Ganglien angesehen und sind meist in der Nähe von Blutgefässen lokalisiert [23, 79]. Jedoch wurden SIF Zellen auch in parasympathischen und sensorischen Ganglien der Ratte beschrieben [43, 95, 96, 102, 114, 134, 242].

Die Funktion der SIF Zellen ist letztendlich noch nicht geklärt. Es wird ihnen aber eine Rolle als Interneurone und/oder neuroendokrine Zellen , aber auch als Vorläuferzellen autonomer Neurone und Zellen des Nebennierenmarks zugeschrieben [23, 35, 67, 110, 131, 189, 241]. Die Hypothese der neuronalen Vorläuferzellen wurde jedoch durch das erst späte Auftreten der SIF Zellen im Ganglion sphenopalatinum (E 18,5) im Gegensatz zum frühen Auftreten im Ganglion cervicale superius (E 13) in Frage gestellt [114, 197].

Untersuchungen zur Entschlüsselung des neuronalen Phänotyps der SIF Zellen wurden hauptsächlich an SIF Zellen in sympathischen Ganglien der Ratte (v.a. Ganglion cervicale superius) durchgeführt. Es wurden sämtliche Transporter und Enzyme für die Dopamin-, Noradrenalin- und Adrenalinsynthese in den SIF Zellen sympathischer Ganglien der Ratte nachgewiesen, d.h. Immunreaktivität für *VMAT-1*, *VMAT-2*, *TH*, *AADC*, *DBH* und *PNMT* [83, 90, 159, 180]. Ausserdem konnten durch Gaschromatographie und Massenfragmentographie verschiedene Konzentrationen von *Dopamin*, *Noradrenalin* und *Adrenalin* in den SIF Zellen der Ratte nachgewiesen werden [63, 82]. Die Existenz von DBH und PNMT in den SIF Zellen der Ratte wurde von einigen Autoren jedoch verneint [90]. VAChT war negativ in SIF Zellen der Ratte [180].

Die Existenz von *HDC* und *Histamin*, ebenso wie von *Serotonin* in SIF Zellen der Ratte wurde von einigen Autoren bestätigt [73, 151, 198], von anderen verneint [90, 72].

Darüberhinaus wurden Immunreaktionen für *VIP*, *MERGL*, *SP*, *CGRP* und *NPY* in SIF Zellen der Ratte nachgewiesen [25, 83, 84, 100, 152]. In den SIF Zellen im Ganglion sphenopalatinum der Ratte wurde die Existenz von VIP hingegen verneint [114].

Koexistenzen in den SIF Zellen der Ratte wurden für VMAT-1/VMAT-2, SP/TH, NPY/TH, VIP/TH, DBH/TH, Histamin/TH, HDC/TH, 5HT/TH, MERGL/VIP und MERGL/VIP/NPY nachgewiesen [25, 83, 151, 180].

2. Fragestellung und Zielsetzung

Die Aufschlüsselung der chemischen Kodierung der Neurotransmission in den kranialen parasympathischen Ganglien der Ratte hat durch die Entdeckung vesikulärer Transportproteine in den letzten Jahren grosse Fortschritte gemacht. Dennoch ist das Gesamtbild der chemischen Ausstattung der Neurone dieser Ganglien im Hinblick auf die verschiedenen Transmittersysteme sowie auf Neuropeptide noch nicht hinreichend geklärt. Zudem wurden fast sämtliche bisherigen Studien an den Ganglien adulter Ratten durchgeführt. Auch über die chemische Kodierung der Small Intensely Flourescent Cells (SIF Zellen) in parasympathischen Ganglien ist derzeit noch sehr wenig bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, in den cholinergen kranialen parasympathischen Ganglien der Ratte mögliche aminerge, serotoninerge, glutamaterge, sowie peptiderge Phänotypen über die Zeitachse der Ontogenese vom embryonalen bis zum adulten Stadium aufzuschlüsseln. Anlass zur Untersuchung aminerger Phänotypen in diesen Ganglien gaben die von Schütz et al 1998 veröffentlichten Ergebnisse, die unter anderem Immunreaktionen für den vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT-2) in einer nicht quantifizierte Anzahl postganglionärer Neurone im Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare im embryonalen Stadium der Ratte zeigten.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des monoaminergen Phänotyps der SIF Zellen, die im adulten Ganglion sphenopalatinum gefunden wurden. Die chemische Ausstattung der SIF Zellen in sympathischen Ganglien der Ratte mit monoaminergen Komponenten ist aus der Literatur bekannt und soll nun an SIF Zellen in parasympathischen Ganglien, wie hier im Ganglion sphenopalatinum, verifiziert werden.

3. Material und Methoden

Zur Bearbeitung der Fragestellung nach der chemischen Kodierung der Neurotransmission in den kranialen parasympathischen Ganglien der Ratte wurde folgendermassen verfahren:
Die verschiedenen Transmittersysteme wurden mittels Immunhistochemie unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen die biogenen Enzyme und die vesikulären Transportproteine der jeweiligen Transmittersysteme untersucht (Tabelle 1.1). Darüberhinaus wurde die Ausstattung der postganglionären Neurone der kranialen parasympathischen Ganglien der Ratte auf den vesikulären Monoamintransporter 1 und 2 (VMAT-1 und -2), den vesikulären Glutamattransporter 1-3 (VGLUT-1-3), den Serotonin-Membrantransporter (SERT), Serotonin (5-HT), Chromogranin A (CgA), Substanz P (SP), die Enkephalin-Vorstufe Met^5-Enkephalin-Arg^6-Gly^7-Leu^8 (MERGL), das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) und das Neuropeptid Y (NPY) mittels spezifischer Antikörper getestet.

Die SIF Zellen, die vor allem im Ganglion sphenopalatinum gefunden wurden, sollten auf ihre Ausstattung mit Komponenten des monoaminergen Transmittersystems mittels Antikörpern gegen VMAT-1, VMAT-2, AADC, DBH und TH (Abkürzungen s.o.). Der Phänotyp der SIF Zellen wurde mittels Doppelfluoreszenz-Immunhistochemie im adulten Stadium dargestellt.

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Ratten, Wistar	Charles River, Sulzfeld

3.1.2 Chemikalien, Enzyme, Kits

ABC Kit	Vector Laboratories
Aceton	Merck
Avidin	Vector Laboratories
Biotin	Vector Laboratories
3,3´Diaminobenzidin (DAB)	Sigma
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Eosin	Merck
Essigsäure 100%	Riedel de Haen
Ethanol	Riedel de Haen
Formaldehyd 37%	Merck
Giemsa	Merck
Hämatoxylin	Merck
Isopropanol	Merck
Kupfer-(II)-Acetat-Monohydrat	Fluka
Methanol	Merck
Natriumchlorid	Riedel de Haen
Natriumhypochlorid	Merck
Natriumthiosulfat	Merck
Natronlauge	Merck
Nickel-Ammoniumsulfat	Fluka
Pikrinsäure	Merck
Rinderserumalbumin (BSA; pH 7,0)	Serva
Salzsäure, 1M	Merck
3-(Triethoxysilyl)-propylamin (TESAP)	Merck
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Riedel-de-Haen

Wasserstoffperoxyd, 30%	Merck
Xylol	Merck
Xylolersatz (Mikroclear)	Vogel
Zitronensäure-Monohydrat	Merck

3.1.3 Verbrauchsmaterial und wiederverwendbare Materialien

Agfapan APX 25	Agfa
Caps	Eppendorf
Deckgläser	Menzel
DePeX	Serva
Dippinggefässe	Amersham
Einbettmedium	Histocomp
Einmalklingen	Feather
FluorSafe®	Reagent
Fotopapier	Agfa
Gewebekassetten	Sakura
Inkubationskammern	Neolab
Kolbenhubpipetten	Eppendorf/Gilson
Laborflaschen	Schott
Messbecher	Schott
Messzylinder	Schott
Objektträger	Menzel
PAP-Pen	Immunotech
Papierfilter	Schleicher&Schuell
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Eppendorf
Plastikwannen	Neolab
Präparationsbesteck	Feather
Quarzküvetten	Hellma
Szinti-Röhrchen	Zinsser
Thermometer	IKA Labortechnik, Staufen

3.1.4 Geräte

Absaugpumpe	KNF Neuberger
Ausbettstation	Vogel
Einbettautomat Tissue Tek	Vogel
Fluoview Konfokal-Apparatur	Olympus
Fotodrucker P-330 E	Olympus
Inkubationsofen	WTB Binder
Kochplatte	Rommelsbacher
Laborwaage	Sartorius
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop AX 70	Olympus
Mikroskop BX 40	Olympus
Mikroskop BX 50 WI	Olympus
pH-Meter CG 840 B	Schott
Präparationsmikroskop SZH 10	Olympus
Reinstwasseranlage (Milli-Q)	Millipore
Rotationsmikrotom HM 325	Microm
Taumler Polymax 1040	Heidolph
Tischzentrifuge	Uniequip
Trockenplatte	Medax
Umluftofen	Heraeus/Memmert
Vortex	IKA Labortechnik, Staufen

3.2 Gewebepräparation und Fixierung

3.2.1 Haltung und Tötung der Versuchstiere

Alle Versuche wurden an Wistar-Ratten durchgeführt, die im institutseigenen Tierstall bis zu ihrer Tötung bei einem künstlichen Tagesrhythmus von 12h Licht und 12h Dunkelheit sowie Wasser und Futter *ad libitum* gehalten wurden.

Die trächtigen Tiere wurden von der Firma Charles River mit Angabe des Schwangerschaftsbeginns geliefert, um die Gewinnung der Embryonen zu definierten

Stadien zu gewährleisten. Der Tag der Geburt der Jungtiere, die zur Untersuchung der postnatalen Stadien dienten, wurde als P1 (1. Tag postnatal) definiert.
Am Versuchstag wurden jeweils 4-6 Tiere (Weibchen und Männchen) in tiefer CO_2-Narkose dekapitiert und nachfolgend präpariert. Um einen Überblick bezüglich einer eventuellen Dynamik einzelner Peptide und Transmitter während der Ontogenese zu erhalten, wurden Tiere zweier embryonaler Stadien (E16 und E19), eines frühen postnatalen Stadiums (P2), zweier später postnataler Stadien (P12 und P20), sowie Tiere im adulten Stadium (älter als vier Wochen) verwendet.

3.2.2 Präparation des Gewebes

Zur Gewinnung des embryonalen Gewebes wurden die Embryonen nach der Tötung des Muttertieres dem Uterus entnommen und durch einen medianen Schnitt in der Sagittalebene in zwei Hälften geteilt und in die Fixanslösung gelegt.

Bei der Präparation der postnatalen Tiere wurde auf zweierlei Weise vorgegangen:
Bis zum sechsten Tag postnatal wurde der Schädel ebenfalls durch einen medianen Schnitt in der Sagittalebene in zwei Hälften geteilt und in die Fixanslösung gelegt. Die Glandula submandibularis wurde separat präpariert und fixiert.
Ab dem sechsten Tag postnatal wurden sämtliche zu untersuchenden Strukturen, grösstenteils unter Zuhilfenahme des Präparationsmikroskopes und speziellen, für die mikroskopische Präparation ausgelegten Präparierbesteckes, separat entnommen.
Das Ganglion sphenopalatinum wurde hierbei durch Orientierung am Verlauf des Nervus maxillaris und Aufsuchen der Fossa sphenopalatina, das Ganglion oticum durch Orientierung am Durchtritt durch die Schädelbasis und Aufsuchen der Fossa infratemporalis gewonnen. Das Ganglion ciliare wurde zusammen mit dem Augenbulbus, einem Teil des Nervus opticus und einem Teil der Tränendrüse *en bloc* entnommen. Ebenso wurde mit dem Ganglion submandibulare verfahren, welches zusammen mit der Glandula submandibularis entnommen wurde.
Insgesamt wurde bei der Gewebeentnahme sehr genau darauf geachtet, das Gewebe weder mit den Präparationsinstrumenten zu quteschen, noch es während der Entnahme austrocknen zu lassen, um Artefakten bei den späteren Untersuchungen vorzubeugen.

3.2.3 Fixierung des Gewebes

Die Präparate wurden sofort nach ihrer Entnahme in Bouin-Holland´scher Lösung fixiert. Als Stammlösung für dieses Fixativ wurde zunächst Bouin´sche Lösung hergestellt und anschliessend für maximal vier Wochen bei + 4° C aufbewahrt. Die Bouin-Holland´sche Lösung wurde jeweils am Präparationstag frisch hergestellt.

Durchführung:

1. Lösen von 25 g Kupfer-(II)-Acetat in Aqua bidest
2. Zufügen von 60 g Pikrinsäure + 50% H_2O
3. Auffüllen mit Aqua bidest auf 1000 ml
4. Filtrieren der Lösung
5. Aufbewahren über maximal 4 Wochen bei + 4° C
6. Zugabe von 10 ml Formaldehyd (37%, säurefrei) und 1 ml Eisessig (Essigsäure 100%) zu jeweils 100 ml Bouin´scher Lösung

Die Präparate wurden, je nach Grösse des Gewebestückes, für 24 – 72 Stunden in der Bouin-Holland´schen Lösung fixiert. Anschliessend erfolgte das Auswaschen des Fixans in 70%-igem Alkohol über vier bis sechs Wochen unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer, wobei der Alkohol täglich erneuert wurde. Nach vollständigem Auswaschen des Fixans wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und optimal orientiert in Paraffin eingebettet.

3.3 Morphologische Aufbereitung

Für eine vollständige Sichtung und morphologische Beurteilung des asservierten Materials wurden histologische Schnitte der paraffineingebetteten Gewebestücke angefertigt und vor der immunhistochemischen Untersuchung mit histologischen Übersichtsfärbungen (Hämatoxylin/Eosin und Giemsa) zur Bestimmung der optimalen Schnittebenen dargestellt. Die hierfür verwendeten Objektträger wurden der besseren Haftung der Gewebeschnitte wegen zuvor mit TESAP beschichtet (s.u.).

3.3.1 Silanisieren der Objektträger

Durchführung:

1. Waschen der Objektträger in heissem Wasser mit Spülmittel (1h)
2. Wässern der Objektträger und Waschen in 70%-igem Alkohol (45 min)
3. Trocknen im Umluftofen bei 60° C
4. Beschichtung der Objektträger: - 30s in 200 ml Aceton + 2 ml TESAP
   - 30s in 200 ml Aceton 1
   - 30s in 200 ml Aceton 2
5. Spülen in Aqua dem. und Aqua bidest (jeweils kurz)
6. Trocknen im Umluftofen bei 42° C

3.3.2 Anfertigen histologischer Schnitte am Rotationsmikroskop

Durchführung:

1. Entgasen und anschliessendes Erwärmen von Aqua bidest auf 42° C
2. Justieren des Paraffinblocks in der gewünschten Orientierung
3. Anfertigung von Folgeschnitten (7 µm)
4. Antrocknen der Schnitte bei 37° C auf der Heizplatte
5. Trocknen der Objektträger bei 52° C über mindestens 8 Stunden
6. Lagerung bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verarbeitung

3.3.3 Anfertigen histologischer Übersichtsfärbungen

Durchführung der Hämatoxylin/Eosin-Färbung:

1. Entparaffinierung der Schnitte in Xylol (3x10 min)
2. Hydrierung in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 80%, 70%) und Aqua bidest über jeweils 5 min
3. Färbung in Hämatoxylinlösung (5 min)
4. Wässern unter fliessendem Leitungswasser (10 min)
5. Färbung in Eosinlösung (1 min)

6. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%, 100%) über jeweils 5 min und Xylol (3x10 min)
7. Eindeckeln in DePeX

Durchführung der Giemsafärbung:

1. Entparaffinierung und Hydrierung der Schnitte (s.o.)
2. Inkubieren der Schnitte in frisch angesetzter Giemsalösung (Lösen von 20 ml Giemsa in 180 ml Aqua bidest und anschliessendes Filtrieren) über 1 Stunde
3. Differenzierung der Rottöne in mit einigen Tropfen Essigsäure gesäuertem Aqua bidest
4. Differenzierung der Blautöne in 96% Alkohol
5. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe und anschliessendes Eindeckeln (s.o.)

3.4 Immunhistochemie

Epitope von Proteinen (Antigene) können unter Verwendung spezifischer Antikörper (Primärantikörper) in paraffineingebettetem Gewebe markiert werden. Die anschliessende Visualisierung der gewebegebundenen Primärantikörper erfolgt über einen enzymatischen Nachweis oder eine farbliche Darstellung mit Fluorochromen. Durch Folgeschnittanalyse oder Fluoreszenz-Doppelmarkierung ist der Nachweis einer Koexpression, bzw. einer Segregation von Neurotransmittern und Neuropeptiden in den zu untersuchenden Neuronen und Fasern möglich.
Die optimale Konzentration des jeweiligen Primärantikörpers wurde vor der Untersuchung genau austitriert.

Die Visualisierung der im Gewebe gebundenen Primärantikörper erfolgte durch den Aufbau einer Kaskade aus einem spezifisch gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper und einer Streptavidin-gekoppelten, biotinylierten Peroxidase mit anschliessender Farbmarkierung durch DAB/Nickel (schwarze Färbung). Alternativ wurden die Fluorochrome A 488 (grün) und A 647 (rot) verwendet (Tabelle 3.2).

3.4.1 Antikörper und Detektionssysteme

Tabelle 3.1: Primärantikörper

Antigen	Abkürzung/Code	Donorspezies	Verdünnung	Quelle/Referenz
α-Calcitonin gene-related peptide	CGRP Y340	rabbit	1:120 000	Yanaihara Institute Inc.
Chromogranin A	CgA Lenny 9	rabbit	1:10 000	Weihe et al 1991
Dopamin-β-Hydroxylase	BP 428	rabbit	1:50	DPC Biermann
Dopamin-β-Hydroxylase	NB 300-112	sheep	1:2000/1:200 (F)	Novus Biologicals
Dopa Decarboxylase	AADC	rabbit	1:500/1:50 (F)	Chemicon
Histidin Decarboxylase	HDC B 260-1	rabbit	1:8000	Eurodiagnostika/ Laboserv
Met-Enkephalin-Arg-Gly-Leu	MERGL Y140	rabbit	1:4000	Yanaihara Institute Inc.
Neuropeptid Y	NPY 8506I	sheep	1:6000/1:1000 (F)	Auspep
Phenylethanolamin-*N*-Methyltransferase	PNMT	rabbit	1:100	Eugene Tech
Serotonin Membrantransporter	SERT	rabbit	1:10 000	DiaSorin
Serotonin	5-HT	rabbit	1:10 000	Bio Tech
Substanz P	SP	rabbit	1:6000	Serva
Tryptophan Hydroxylase	TpH	sheep	1:100/1:10 (F)	Chemicon
Tyrosin Hydroxylase	TH-mono	mouse	1:20	Boehringer Mannheim
Tyrosin Hydroxylase	TH	sheep	1:400/1:50 (F)	Chemicon
Vesikulärer Acetylcholintransporter	VAChT (80259)	rabbit	1:1500/1:150 (F)	Weihe et al 1996 Schäfer et al 1998
Vesikulärer Acetylcholintransporter	VAChT (1624)	goat	1:150 (F)	Chemicon
Vesikulärer Monoamintransporter 1	VMAT-1 (68477)	rabbit	1:1500	Erickson et al 1996
Vesikulärer Monoamintransporter 2	VMAT-2 (80182)	rabbit	1:1500/1:150 (F)	Erickson et al 1996
Vesikulärer Monoamintransporter 2	VMAT-2 (80214)	guinea pig	1:300 (F)	Calbiochem
Vesikulärer Glutamattransporter 1	VGLUT-1 Chem	guinea pig	1:4000	Chemicon
Vesikulärer Glutamattransporter 1	VGLUT-1 Erickson	rabbit	1:6000	Erickson
Vesikulärer Glutamattransporter 2	VGLUT-2 Chem	guinea pig	1:4000	Chemicon
Vesikulärer Glutamattransporter 2	VGLUT-2 Erickson	guinea pig	1:8000	Erickson
Vesikulärer Glutamattransporter 3	VGLUT-3 Erickson	rabbit	1:6000	Erickson
Vasoaktives Intestinales Polypeptid	VIP Y010	rabbit	1:6000/1:600 (F)	Yanaihara Institute Inc.

(F) = Verdünnung für Fluoreszenz-Immunhistochemie

Tabelle 3.2: Sekundärantikörper und Detektionssysteme

Detektionssystem	Donorspezies	Verdünnung	Quelle
ABC Kit			Vector Laboratories
anti-goat-IgG-Biotin	donkey	1:200	Jackson ImmunoResearch
anti-guinea pig-IgG-Biotin	donkey	1:200	Jackson ImmunoResearch
anti-rabbit-IgG-Biotin	donkey	1:200	Jackson ImmunoResearch
anti-mouse-IgG-Biotin	donkey	1:200	Jackson ImmunoResearch
anti-sheep-IgG-Biotin	donkey	1:200	Jackson ImmunoResearch
Alexa Fluor 488 anti-goat-IgG	donkey	1:200	Mo Bi Tec
Alexa Fluor 488 anti-guinea pig-IgG	goat	1:200	Mo Bi Tec
Alexa Fluor 488 anti-rabbit-IgG	donkey	1:200	Mo Bi Tec
Alexa Fluor 488 anti-mouse-IgG	donkey	1:200	Mo Bi Tec
Alexa Fluor 488 anti-sheep-IgG	donkey	1:200	Mo Bi Tec
Alexa Fluor 647 anti-goat-IgG	donkey	1:200	Mo Bi Tec
Alexa Fluor 647 anti-rabbit-IgG	chicken	1:200	Mo Bi Tec
Alexa Fluor 647 anti-mouse-IgG	chicken	1:200	Mo Bi Tec
Alexa Fluor 647 anti-sheep-IgG	donkey	1:200	Mo Bi Tec
Alexa Fluor 488 Streptavidin		1:200	Mo Bi Tec
Alexa Fluor 647 Streptavidin		1:200	Mo Bi Tec
horseradish peroxidase			Vector Laboratories

3.4.2 DAB/Nickel verstärkte Immunhistochemie

Material:

Xylol, absteigende und aufsteigende Isopropanolreihen (100%, 96%, 80%,70%), Methanol, H_2O_2, Aqua bidest, BSA, ABC-Kit, Avidin, Biotin, PAP-Pen, 10 mM Citratpuffer, 50 mM Phosphatpuffer, Kochtopf, Kochplatte, Thermometer, 1% und 5% BSA in 50 mM Phosphatpuffer, 12,5 mg/ml DAB, 75 mg/ml Nickel-Ammoniumsulfat, Primärantikörper, biotinylierte Sekundärantikörper, Streptavidin-Peroxidase, Deckgläschen, DePeX, Objektträgerständer, Laborflaschen, Saugpumpe, Pipetten

Herstellung des 10 mM Citratpuffers (pH 6,0)

Material:
Zitronensäure-Monohydrat, Natriumcitrat-Dihydrat, Aqua bidest, pH-Meter

Durchführung:

1. Herstellung von 0,1 M Zitronensäurelösung: Lösen von 21,01 g Zitronensäure-Monohydrat in 1000 ml Aqua bidest (Lösung A)
2. Herstellung von 0,1 M Natriumcitratlösung: Lösen von 29,41 g Natriumcitrat-Dihydrat in 1000 ml Aqua bidest (Lösung B)
3. Herstellung von 3 l 0,01 M Natriumcitratpuffer: 54 ml Lösung A + 246 ml Lösung B mit Aqua bidest auf 3000 ml auffüllen, mischen und ggf. pH einstellen

Herstellung des 50 mM Phosphatpuffers (pH 7,45)

Material:
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Natriumchlorid, Aqua bidest, pH-Meter

Durchführung:

1. Lösen von 6,55 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, 36,05 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 45,00 g Natriumchlorid in 4500 ml Aqua bidest
2. pH-Einstellung auf 7,45
3. Auffüllen auf 5000 ml mit Aqua bidest

DAB/Nickel verstärkte Immunhistochemie mit Streptavidin-Peroxidase

Durchführung:

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol (3x10 min)
2. 100% Isopropanol (10 min)

3. Blockieren unspezifischer Gewebeperoxidasen in Methanol unter initialer Zugabe von 0,1% H_2O_2 (3 ml H_2O_2 zu 800 ml Methanol) (30 min)
4. Hydrieren in absteigender Alkoholreihe: 100% (10 min), 96%, 80%, 70% (je 5 min) und Aqua bidest (2x5 min); derweil Erhitzen von 3 l 0,01 M Natriumcitratpuffer auf 95° C
5. Umsortieren der Schnitte in 24-Fach Ständer und Kochen der Objektträger bei 92-95° C (15 min)
6. Wässern in Aqua bidest (2x10 min)
7. Trockensaugen und Umranden der Schnitte mit dem PAP-Pen
8. Blockieren unspezifischer Bindungen in 5% BSA in 50 mM Phosphatpuffer (30 min)
9. 1% BSA in 50 mM Phosphatpuffer (3x5 min)
10. Trockensaugen des Schnittes und Auftragen des Primärantikörpers in der Arbeitsverdünnung
11. Inkubation im Wärmeschrank über Nacht bei 16° C; anschliessend 2 Stunden bei 37° C
12. Entfernen des Antikörperüberschusses durch Waschen in Aqua bidest (3x5 min)
13. Äquilibrieren in 50 mM Phosphatpuffer (10 min)
14. Trockensaugen des Schnittes und Auftragen des biotinylierten Sekundärantikörpers in der Arbeitsverdünnung
15. Inkubation im Wärmeschrank bei 37° C (45 min)
16. Entfernen des Antikörperüberschusses durch Waschen in Aqua bidest (3x5 min)
17. Äquilibrieren in 50 mM Phosphatpuffer (10 min)
18. Trockensaugen des Schnittes und Auftragen des Streptavidin-Peroxidase Antikörpers in der Arbeitsverdünnung
19. Inkubation im Wärmeschrank bei 37° C (2 Stunden)
20. Entfernen des Antikörperüberschusses durch Waschen in Aqua bidest (3x5 min)
21. Äquilibrieren in 50 mM Phosphatpuffer (10 min)
22. Inkubation in der Färbelösung (75 mg DAB und 450 mg Nickel-Ammoniumsulfat in 800 ml 50 mM Phosphatpuffer) (5 min)
23. Durchführen der Farbreaktion unter Zugabe von 112 µl H_2O_2 (8 min)

24. Stoppen der Farbreaktion durch Überführen der Objektträger in Aqua bidest (3x5 min); Neutralisieren der Färbelösung durch Zugabe einer geringen Menge Natriumhypochlorid
25. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe: 70%, 80%, 96%, 100% (je 5 min) und Xylol (3x10 min)
26. Eindeckeln in DePeX

DAB/Nickel verstärkte Immunhistochemie mit Avidin-/Biotin-Blockade und dem ABC-Kit

Durchführung:

Arbeitsschritte1-7 entsprechen der Immunhistochemie mit Streptavidin-Peroxidase

8. Blockieren unspezifischer Bindungen in 5% BSA-50 mM Phosphatpuffer (30 min)
9. 1% BSA-50 mM Phosphatpuffer (5 min)
10. Blockade mit 30% Avidin in 1% PSA-50 mM Phosphatpuffer (20 min)
11. 1% BSA-50 mM Phosphatpuffer (5 min)
12. Blockade mit 30% Biotin in 1% PSA-50 mM Phosphatpuffer (20 min)
13. 1% BSA-50 mM Phosphatpuffer (5 min)

Die nächsten Arbeitsschritte entsprechen den Arbeitsschritten 10-17 der Immunhistochemie mit Streptavidin-Peroxidase

18. Trockensaugen des Schnittes und Auftragen des AB-Komplexes (Ansatz: Zugabe von je 50 µl der Lösung A und Lösung B in 1% BSA-50 mM Phosphatpuffer und Inkubation der angesetzten Lösung über 30 min bei Raumtemperatur)
19. Inkubation im Wärmeschrank bei 37° C (30 min)

Die übrigen Arbeitsschritte entsprechen wieder denen der obengenannten immunhistochemischen Methode

3.4.3 Doppelfluoreszenz-Immunhistochemie

Um den Aufbau zweier Detektionskaskaden an ein und demselben Gewebeschnitt zu erzielen wurden zwei Primärantikörper verschiedener Spezies gleichzeitig aufgetropft. In einem zweiten Schritt wurde der gegen den zweiten Primärantikörper gerichtete, Spezies-spezifische, biotinylierte Sekundärantikörper inkubiert (ebenfalls 45 min bei 37° C). In einem dritten Inkubationsschritt erfolgte die Detektion über den direkt Fluorochrom-markierten, Spezies-spezifischen Sekundärantikörper, gegen den ersten Primärantikörper gerichtet, simultan mit Fluorochrom-marktiertem Streptavidin (2 Stunden bei 37° C). Verwendet wurden die Fluorochrome A 488 und A 647 (Tabelle 3.2). Eingedeckelt wurden die Gewebeschnitte nach Ablauf der Doppelfluoreszenz-Immunhistochemie mit FluorSafe®, was eine vorherige Dehydrierung überflüssig machte.
Vor Beginn der Doppelfluoreszenz-Immunhistochemie erfolgte eine Kontrolle von Emission und Absorption der Fluorochrome an einfachmarkierten Schnitten.

3.5 Quantitative Auswertung und Fotodokumentation

Zur quantitativen Auswertung der Ergebnisse wurden an 3 – 5 Ganglien je Stadium mindestens 100 Zellen pro Ganglion ausgezählt (bei weniger als 100 Zellen Gesamtzellzahl, wie zB. im Fall des Ganglion ciliare wurden alle Zellen ausgezählt) und diese durch Vergleich zu dem entsprechenden VAChT, bzw. Giemsa gefärbten Schnitt, bzw. durch Interferenzmikroskopie in Relation zu den positiven Zellen gesetzt. Somit war eine prozentuale Angabe der positiven Reaktionen der jeweiligen Primärantikörper pro Ganglion und pro Stadium möglich (siehe Abbildungen 4.4 – 4.6, 4.12 – 4.14, 4.20 – 4.22, 4.28 – 4.30, bzw. Tabelle 4.1))

Die Ergebnisse wurden für die DAB/Nickel verstärkten Immunhistochemie durch Schwarz-Weiss Fotografie, bzw. für die Doppelfluoreszenz-Immunhistochemie durch elektronische Speicherung und Fotoausdrucke der Bilder dokumentiert.

4. Ergebnisse

4.1 Ganglion oticum

4.1.1 Vesikuläre Transportproteine

VACHT: Die Expression von VAChT, dem obligaten vesikulären Transportprotein für Acetylcholin in cholinergen Neuronen, konnte in der Hauptpopulation der Neurone des Ganglion oticum (über 99%) permanent während der Entwicklung beobachtet werden (Abb. 4.1, A-D). In der Reaktionsstärke zeigten sich geringfügige Unterschiede zwischen den Neuronen. Singuläre VAChT-negative Neurone waren nur vereinzelt zu sehen (Abb. 4.1, D). Zu allen Entwicklungsstadien war eine grosse Anzahl VAChT-positiver prä- und postganglionärer Fasern zu beobachten.

VMAT-2: VMAT-2, das vesikuläre Transportprotein in katecholaminergen, serotoninergen und histaminergen Neuronen zeigte eine transiente Expression in den Neuronen des Ganglion oticum während der Entwicklung (Abb. 4.1, E-H). Die grösste Anzahl VMAT-2-positiver Neurone (etwa 95%) wurde embryonal beobachtet (Abb. 4.1, E). Postnatal nahm diese Zahl sukzessive ab. Im adulten Stadium waren nur noch sehr selten einzelne, schwach VMAT-2-positive Neurone zu sehen (Abb. 4.1, H). Es waren während der gesamten Entwicklung deutliche Unterschiede in der Reaktionsstärke zwischen den einzelnen Neuronen zu erkennen (Abb. 4.1, F).
Eine Expression von VMAT-1 war zu keinem Zeitpunkt während der Entwicklung in den postganglionären Neuronen des Ganglion oticum zu beobachten (Daten nicht gezeigt).
VGLUT: Um einen möglichen glutamatergen Phänotyp in den postanglionären Neuronen des Ganglion oticum zu untersuchen, wurde die Immunreaktivität für VGLUT-1 bis -3, die etablierten Marker glutamaterger Neurone, getestet. Alle drei Isotypen des vesikulären Glutamattransporters waren negativ in den Neuronen.

Lediglich VGLUT-2 zeigte leicht positive Immunreaktionen in vereinzelten Fasern im Ganglion oticum, was die Vermutung auf die Existenz sensorischer Kollateralen, wahrscheinlich aus dem Ganglion trigeminale, zuliess (Daten nicht gezeigt).

4.1.2 Biogene Enzyme

TH: Zur Untersuchung des katecholaminergen Phänotyps in den Neuronen des Ganglion oticum wurde die Immunreaktivität für TH, dem ratenlimitierenden Enzym der Katecholaminbiosynthese getestet. TH war während der gesamten Entwicklung permanent nur in singulären, meist aber stark positiven Neuronen exprimiert (Abb. 4.1, I-L). Um den zweiten postnatalen Tag herum konnte ein vorübergehender Anstieg der Zahl TH-positiver Neurone beobachtet werden. In den singulären TH-positiven Neuronen im adulten Stadium koexistierte teilweise DBH (Abb. 4.8, J-L). Es zeigte sich eine grössere Anzahl TH-positiver Fasern innerhalb des Ganglion oticum im adulten Stadium. In diesen Fasern war teilweise VMAT-2 koexprimiert (Abb. 4.8, G-I).

AADC: Für AADC, dem, sowohl in der Dopaminsynthese, als auch in der Serotoninsynthese vorkommenden Enzym konnte überraschenderweise eine permanente Expression in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion oticum mit deutlichem Aufwärtstrend während der Entwicklung festgestellt werden (Abb. 4.2, A-D). Die Anzahl der AADC-positiven Neurone vergrösserte sich von 35% embryonal auf 85% im adulten Stadium. Der Unterschied der Reaktionsstärke zwischen den Neuronen war teilweise beträchtlich. Die Fluoreszenz-Doppelmarkierung zeigte eine Koexistenz von AADC mit VAChT in der Hauptpopulation der Neurone (Abb. 4.7, A-C). Es fiel eine eher perinukleäre Verteilung von AADC innerhalb der Neurone auf. AADC-Immunreaktivität konnte auch in Fasern festgestellt werden. In den AADC-positiven präganglionären Fasern an den Neuronen koexistierte teilweise VMAT-2 (Abb. 4.8, D-F).
Der Nachweis der AADC-Immunreaktivität in den postganglionären Neuronen des Ganglion oticum liess die Vermutung sowohl auf die Existenz eines dopaminergen, als auch eines serotoninergen Phänotyps zu.

DBH: Um einen möglichen noradrenergen Phänotyp in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion oticum zu untersuchen wurde die DBH-Immunreaktivität in den Neuronen getestet. Interessanterweise zeigte sich eine permanente Expression von DBH während der Entwicklung in über 90% der Neurone (Abb. 4.1, M-P). Die Reaktionsstärke der positiven Neurone differierte teilweise. Die Koexistenz von DBH und VAChT in der Hauptpopulation der postganglionären Neurone des Ganglion oticum ist mittels der Fluoreszenz-Doppelmarkierung in Abb. 4.7, D-F dargestellt. Auch in den singulär auftretenden TH-positiven Neuronen war DBH koexprimiert (Abb. 4.8, J-L). Die Expression von DBH innerhalb der Neurone war panzellulär. DBH-Immunreaktivität zeigte sich in einer eher spärlichen Anzahl von Fasern.
Aufgrund des Nachweises der Expression von DBH in den postganglionären Neuronen des Ganglion oticum war Evidenz für die Existenz eines noradrenergen Phänotyps gegeben.

PNMT: Das Enzym für den letzten Reaktionsschritt in der Katecholaminsynthese, PNMT, war zu keinem Zeitpunkt während der Entwicklung in den Neuronen des Ganglion oticum zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Somit gab es keinen Anhaltspunkt für die Existenz eines adrenergen Phänotyps.

TpH: Das für serotoninerge Neurone spezifische Enzym Tryptophan-Hydroxylase konnte zu keinem Zeitpunkt während der Entwicklung in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion oticum nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch der Serotonin-Membrantransporter (SERT) und Serotonin (5-HT) waren negativ in den Neuronen (Daten nicht gezeigt). Evidenz für die Existenz eines serotoninergen Phänotyps war somit nicht gegeben.

HDC: Das einzige Enzym der Histaminsynthese, HDC, konnte überraschenderweise in den postganglionären Neuronen des Ganglion oticum nachgewiesen werden (Abb. 4.2, E-H). Die HDC-Expression zeigte eine vorübergehende Abnahme kurz nach der Geburt. Die Anzahl der HDC-positiven Neurone sank von 45% embryonal auf 15% am zweiten postnanalen Tag (Abb. 4.2, E und F). Anschliessend stieg die Anzahl der HDC-positiven Neurone bis zum adulten Stadium auf 90% an (Abb. 4.2, H). Die Stärke der HDC-Reaktion in den Neuronen differierte teilweise beträchtlich. Die Koexpression von HDC mit VAChT in der Hauptpopulation der Neurone des

Ganglion oticum ist mittels Fluoreszenz-Doppelmarkierung in Abb. 4.7, G-I dargestellt. Die HDC-Immunreaktivität innerhalb der Neurone zeigte eine Tendenz zur perimetrischen Verteilung. Eine grosse Anzahl von Fasern innerhalb des Ganglion oticum war HDC-positiv. HDC-Immunreaktivität war ebenfalls in Mastzellen zu beobachten.

4.1.3 Neuropeptide und Chromogranin A

VIP: Der zur Sekretin/Glukagon-Familie gehörende cholinerge Kotransmitter VIP konnte permanent und konstant in der Hauptpopulation der Neurone des Ganglion oticum (über 99%) während der Entwicklung nachgewiesen werden (Abb. 4.3, A-D). Hin und wieder konnten vereinzelte VIP-negative Neurone beobachtet werden (Abb. 4.3, D). Es waren kaum Unterschiede in der Reaktionsstärke zwischen den Neuronen zu sehen. Auch in Fasern war VIP-Expression zu beobachten.

NPY: Der noradrenerge Kotransmitter NPY zeigte eine permanente Expression in den Neuronen mit einer tendentiellen Zunahme während der Entwicklung (Abb. 4.3, M-P). Die Anzahl der NPY-positiven Neurone stieg von 45% embryonal auf über 80% im adulten Stadium an. Es waren deutliche Unterschiede in der Reaktionsstärke zwischen den Neuronen festzustellen. Die Reaktionsstärke insgesamt nahm über die Entwicklung leicht zu. In den NPY-positiven Neuronen koexistierte VAChT (Abb. 4.8, A-C). NPY-Immunreaktivität zeigte sich auch in Fasern innerhalb des Ganglion oticum.

CGRP: Das in sensorischen Neuronen vorkommende Neuropeptid CGRP war erstaunlicherweise in einer grossen Population der Neurone des Ganglion oticum permanent über die Entwicklung exprimiert (Abb. 4.3, J-L). CGRP-positive Neurone waren embryonal in grosser Anzahl (95%) zu sehen (Abb. 4.3, I). Postnatal nahm die Zahl der CGRP-positiven Neurone leicht ab und blieb bei etwa 85% bis zum adulten Stadium konstant. Der Unterschied der Reaktionsstärke zwischen den einzelnen Neuronen nahm während der prä- und postnatalen Entwicklung zu. CGRP koexistierte mit VAChT in der Hauptpopulation der Neurone im Ganglion oticum und war innerhalb der Neurone eher in der Zirkumferenz exprimiert (Abb. 4.7, J-L). In

Fasern, die grossteils enge Kontakte zu den Neuronen hatten, war ebenfalls CGRP exprimiert, was auf sensible Kollateralen des Ganglion trigeminale hinweisen könnte.

MERGL: Die Expression des Proopioidderivates MERGL nahm von von etwa 60% positive Neurone embryonal auf 85% positive Neurone im adulten Stadium im Ganglion oticum zu (Abb. 4.2, M-P). Die Intensität der MERGL-Immunreaktionen in den Neuronen war grösstenteils sehr hoch. Es waren aber auch einige relativ schwach MERGL-positive Neurone zu beobachten. Zusätzlich waren auch viele Fasern zu sehen, die MERGL-Immunreaktivität aufwiesen.

SP: Das Präprotachykinin SP war permanent in der Hauptpopulation der neuronalen Zellkörper des Ganglion oticum exprimiert (Abb. 4.3, E-H). Die Anzahl der SP-positiven Neurone schwankte während der Entwicklung zwischen 90% und 95%. Es waren nur geringe Unterschiede in der Reaktionsstärke zwischen den Neuronen zu sehen. Auch SP-positive Fasern waren in grosser Anzahl im Ganglion oticum zu beobachten.

CgA: Um die Ausstattung der Neurone mit Vesikeln insgesamt zu untersuchen wurde die Immunreaktivität von CgA, einem obligaten Vesikulogen getestet. CgA-Expression zeigten etwa 98% der Neurone permanent während der Entwicklung (Abb. 4.2, I-L). Es konnten teilweise singuläre CgA-negative Neurone beobachtet werden (Abb. 4.2, K). Die Intensität der CgA-Immunreaktion nahm bis zum adulten Stadium in den meisten Neuronen erheblich ab. CgA-positive Fasern waren nur vereinzelt zu sehen.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.4 – 4.6 graphisch dargestellt und in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

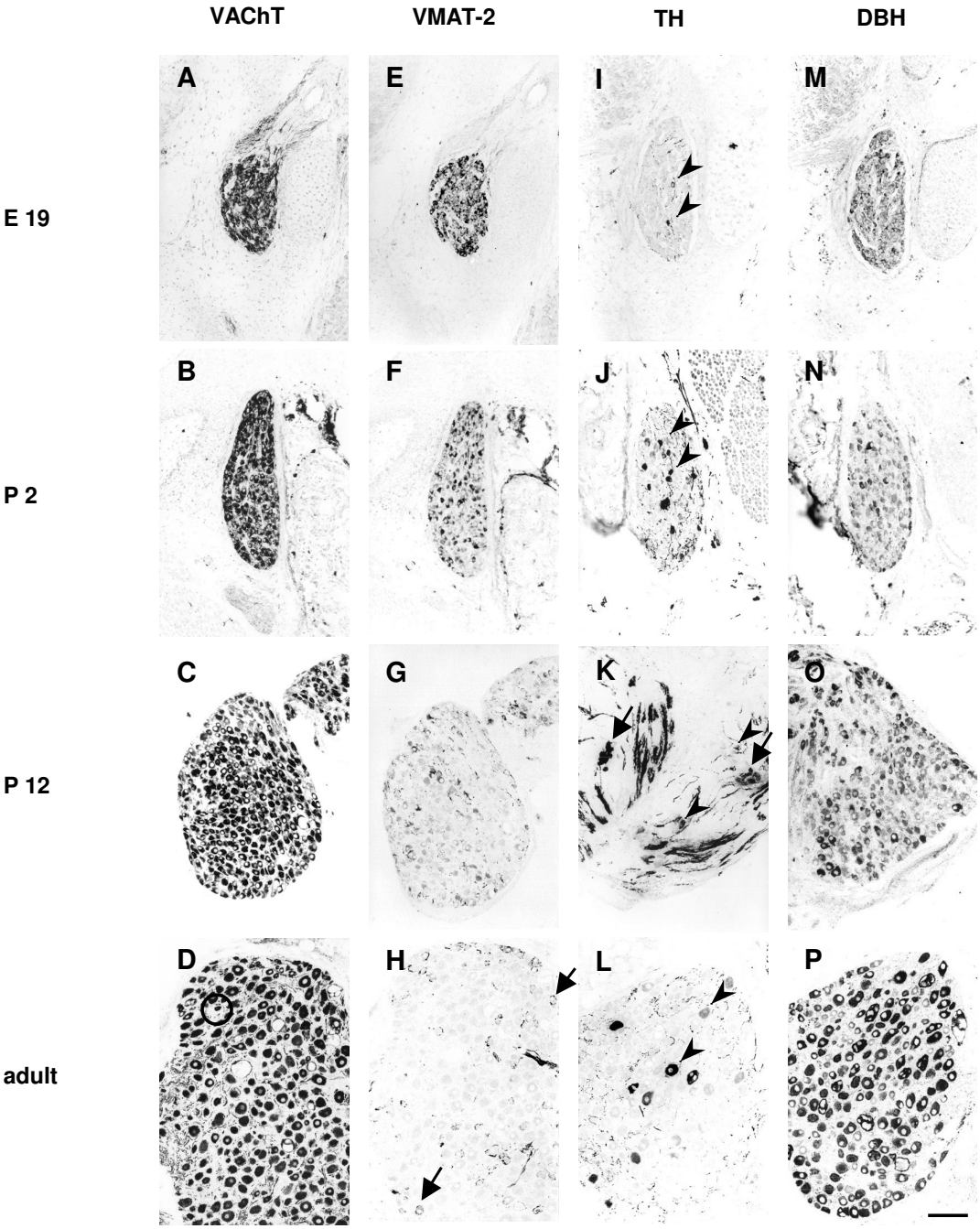

Abbildung 4.1: DAB/Nickel-Immunhistochemie für VAChT, VMAT-2, TH und DBH im Ganglion oticum über die Entwicklung

Konstant hohe Expression von VAChT (Bilder A-D, eingekreist in D: VAChT-negatives Neuron) und DBH (Bilder M-P) in Neuronen mit unterschiedlicher Expressionsstärke; dagegen Abnahme der Expression von VMAT-2 (Bilder E-H), Pfeil in H weist auf VMAT-2-positives Neuron; Expression von TH (Bilder I-L) nur in Subpopulation während der Entwicklung, Pfeilköpfe weisen exemplarisch auf TH-positive Neurone; Pfeile in K weisen auf stark TH-positive SIF Zellen (s.u.); Skalabalken in P für Bilder A-P = 50 µm.

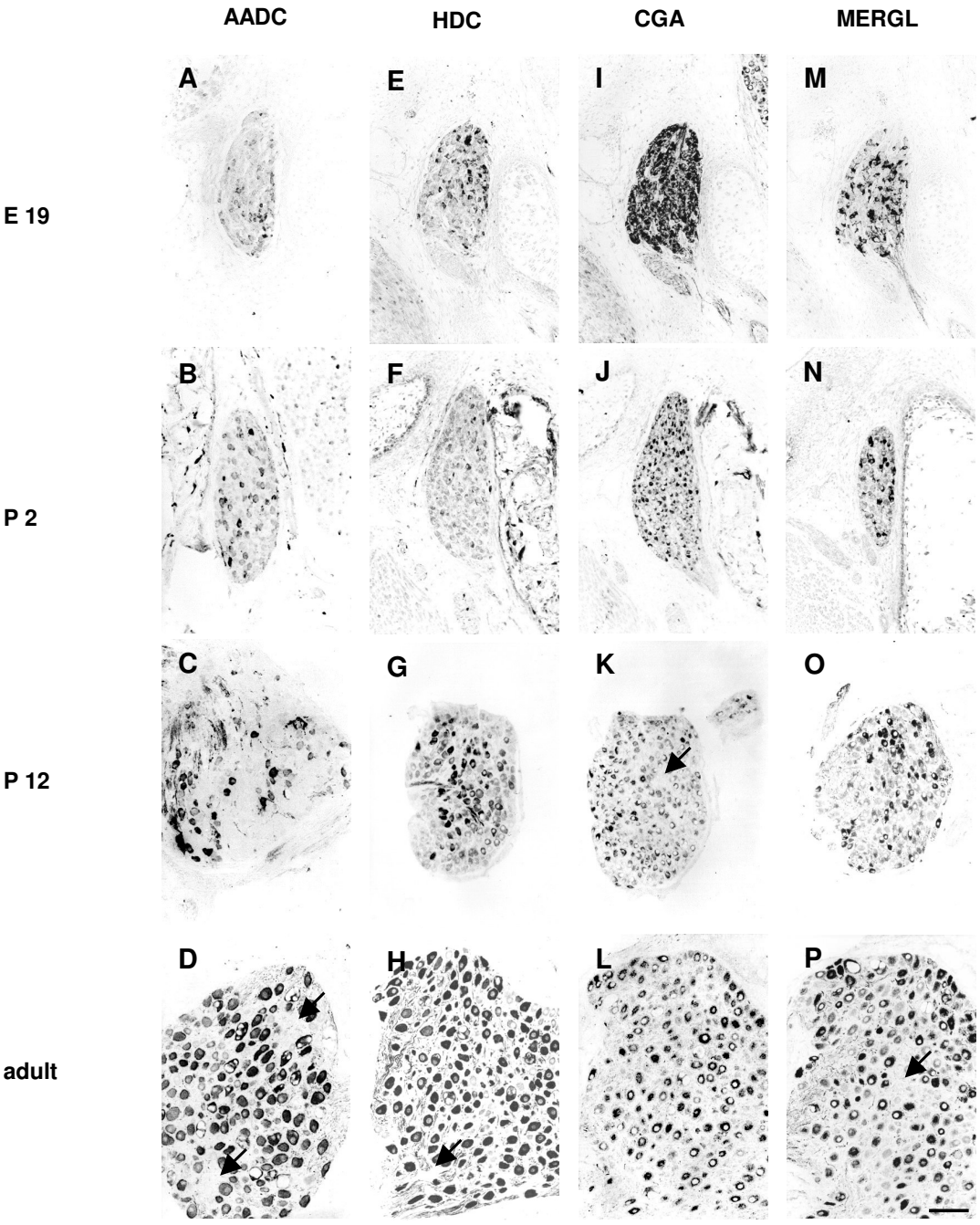

Abbildung 4.2: DAB/Nickel-Immunhistochemie für AADC, HDC, CgA und MERGL im Ganglion oticum über die Entwicklung

Konstante Zunahme der Expression von AADC (Bilder A-D) und MERGL (Bilder M-P) in jeweils unterschiedlicher Reaktionsstärke. Die Pfeile in Bild D und P weisen exemplarisch auf AADC-negative Neurone. Kurzzeitige Abnahme der Expression von HDC in frühen postnatalen Stadien mit anschliessendem Anstieg bis zum adulten Stadium (Bild E-H), Pfeil in H weist exemplarisch auf HDC-negatives Neuron. Gleichbleibend hohe Expression von CgA (Bilder I-L), jedoch unterschiedlicher Expressionsstärke. Skalabalken in P für Bilder A-P = 50 µm.

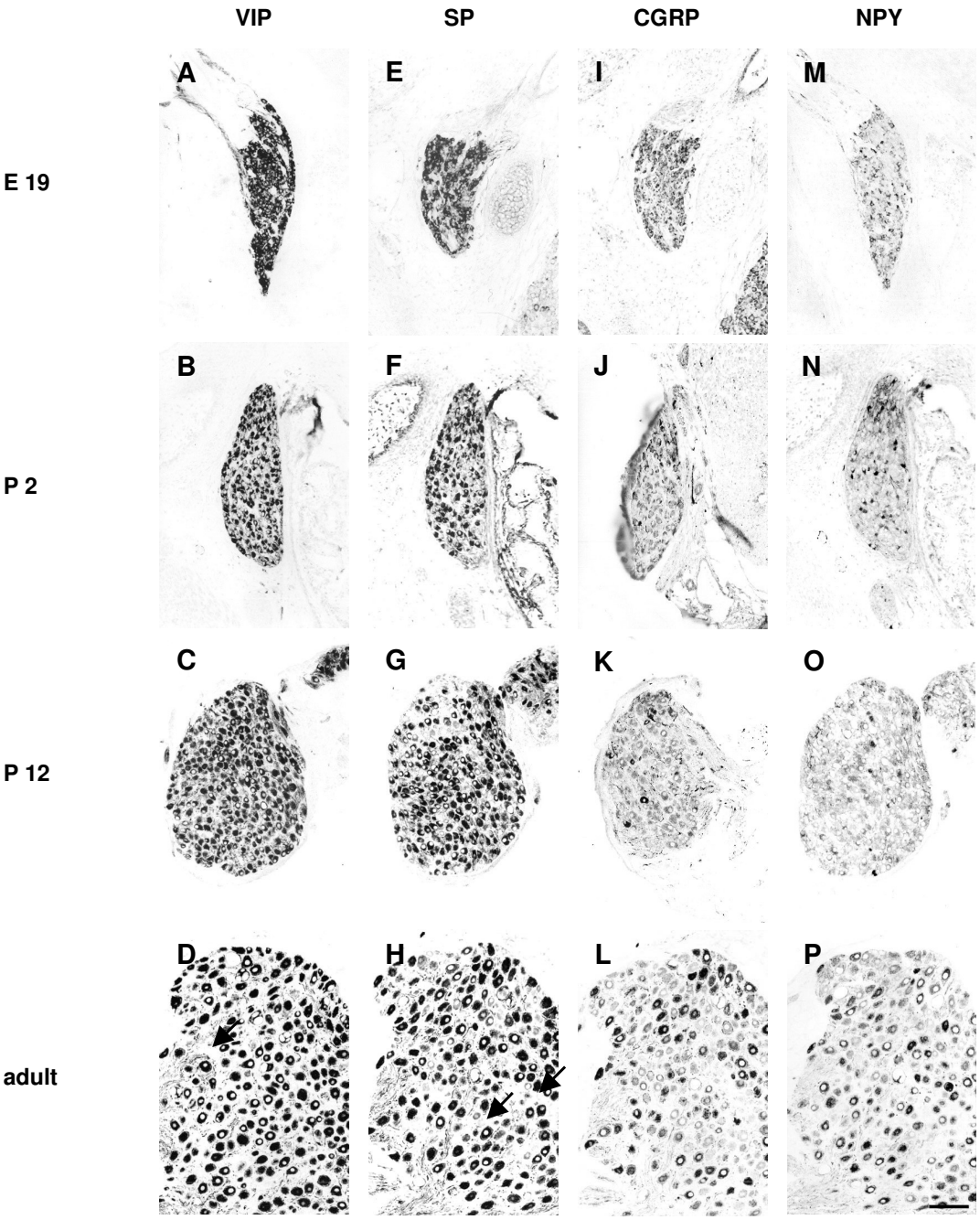

Abbildung 4.3: DAB/Nickel-Immunhistochemie für VIP, SP, CGRP und NPY im Ganglion oticum über die Entwicklung

Konstant hohe Expression von VIP (Bilder A-D) mit singulären reaktionsnegativen Neuronen (Pfeil in D). Leichte Schwankung der insgesamt hohen Expression von SP (Bilder E-H), Reaktionsstärke relativ gleichbleibend; Pfeile in H weisen exemplarisch auf reaktionsnegative Neurone. Postnatal leichte Abnahme der Expression von CGRP (Bilder I-L), danach ungefähr gleichbleibend bis zum adulten Stadium. Zunahme der Expression und der Expressionsstärke von NPY in den Neuronen (Bilder M-P). Skalabalken in P für Bilder A-P = 50 µm.

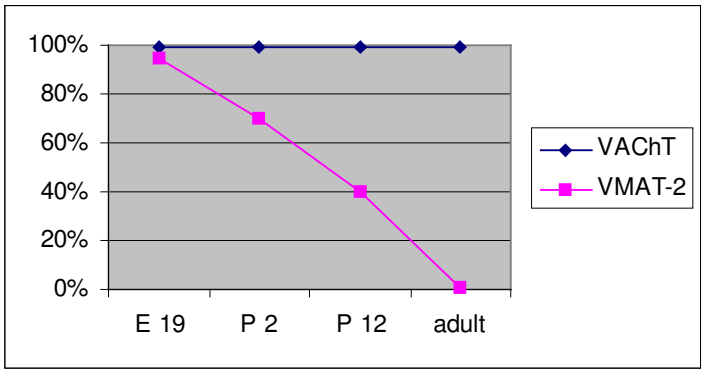

Abbildung 4.4: Verlauf der Expression von VAChT und VMAT-2 in den Neuronen des Ganglion oticum während der Entwicklung

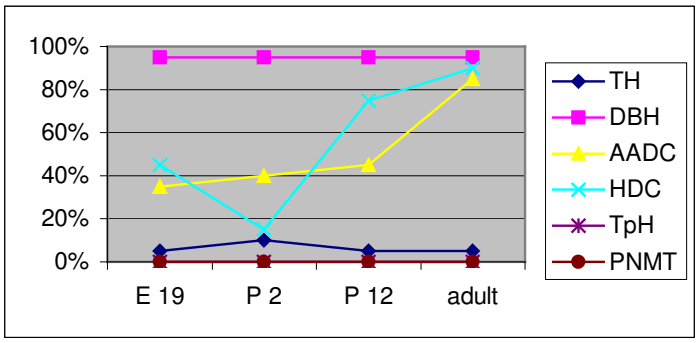

Abbildung 4.5: Verlauf der Expression von TH, DBH, AADC, HDC, TpH und PNMT in den Neuronen des Ganglion oticum während der Entwicklung

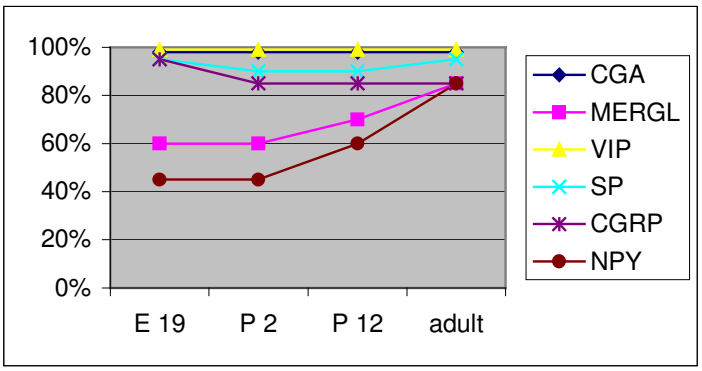

Abbildung 4.6: Verlauf der Expression von CgA, MERGL, VIP, SP, CGRP und NPY in den Neuronen des Ganglion oticum während der Entwicklung

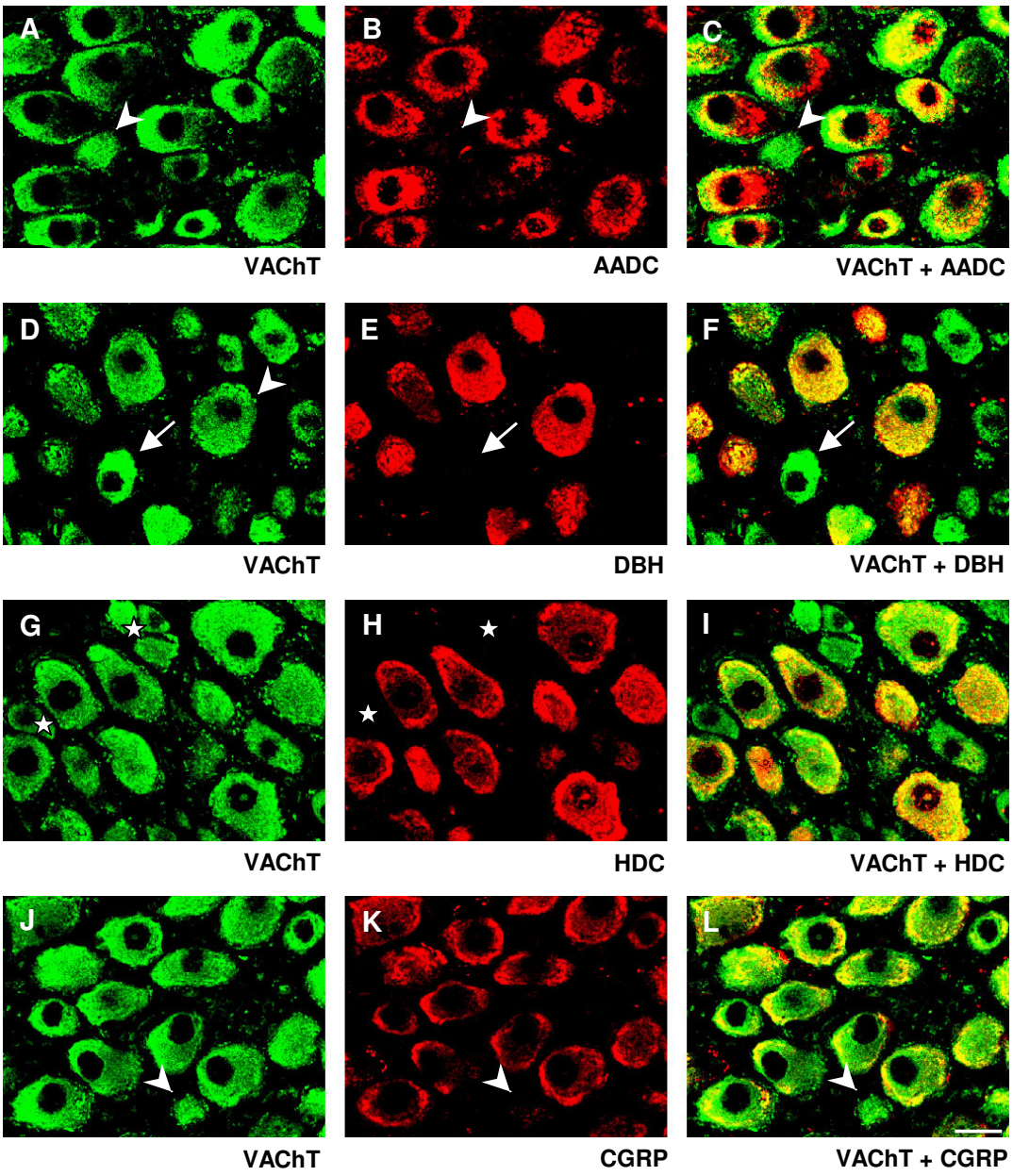

Abbildung 4.7: Fluoreszenz-Doppelmarkierung für VAChT gegen AADC, DBH, HDC und CGRP im adulten Ganglion oticum

Koexistenz von VAChT mit AADC (Bild A-C), DBH (Bild D-F), HDC (Bild G-I) und CGRP (Bild J-L) jeweils in der Hauptpopulation der Neurone. Pfeilköpfe in B und K, Pfeil in E und Sterne in H weisen jeweils auf nicht-kopositive Neurone. Pfeilkopf in D weist exemplarisch auf VAChT-positive präganglionäre Terminale. Man beachte die eher perinukleäre Verteilung von AADC in B und die eher perimetrische Verteilung von HDC und CGRP in H und K in den Neuronen. Skalabalken in L für Bilder A-L = 20 µm

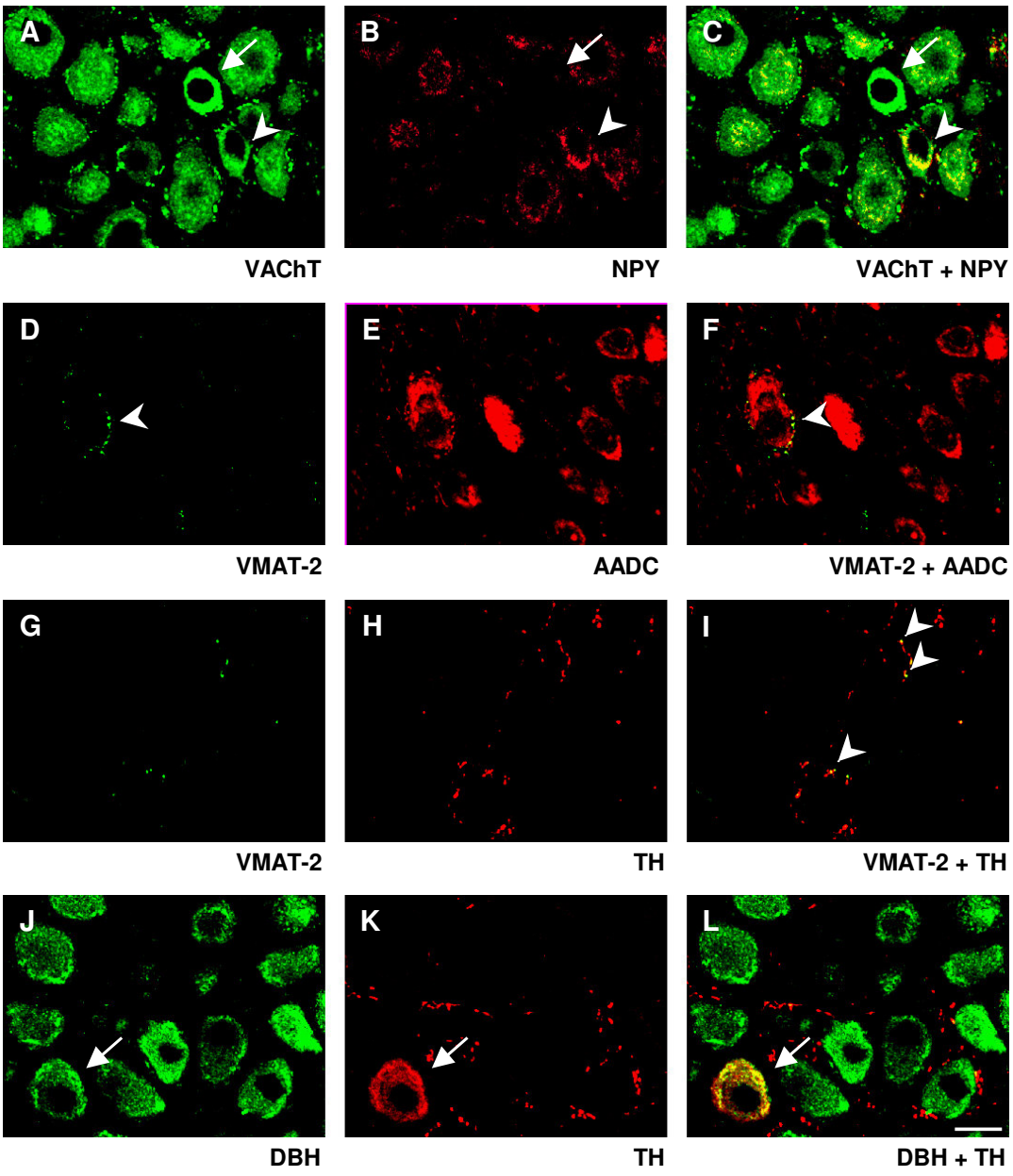

Abbildung 4.8: Fluoreszenz-Doppelmarkierung für VAChT gegen NPY, VMAT-2 gegen AADC und TH, sowie DBH gegen TH im adulten Ganglion oticum

Geringe Koexistenz von VAChT und NPY (Bild A-C); Pfeilköpfe weisen exemplarisch auf ein kopositives Neuron, Pfeile weisen exemplarisch auf ein nicht-kopositives Neuron. Keine Koexistenz von VMAT-2 und AADC in den präganglionären Fasern (Pfeilköpfe in D und F). Koexistenz von VMAT-2 und TH in einzelnen präganglionären Fasern (Pfeilköpfe in I). In den singulär vorkommenden TH-positiven Neuronen koexistiert DBH (Pfeile in G-I). Skalabalken in L für Bilder A-L = 20 µm

4.2 Ganglion sphenopalatinum

4.2.1 Vesikuläre Transportproteine

VAChT: Die Expression von VAChT, dem Membranprotein, das Acetylcholin in die synaptischen Vesikel transportiert und obligat in cholinergen Neuronen vorkommt, konnte in der Hauptpopulation der neuronalen Zellkörper des Ganglion sphenopalatinum (über 99%) permanent während der Entwicklung nachgewiesen werden (Abb. 4.9, A-D). In der Reaktionsstärke zeigten sich geringfügige Unterschiede zwischen den Neuronen. Singuläre VAChT-negative Neurone im Ganglion sphenopalatinum waren nur vereinzelt zu sehen (Abb. 4.9, D). Zu allen Entwicklungsstadien war eine grosse Anzahl VAChT-positiver prä- und postganglionärer Fasern zu beobachten.

VMAT-2: Für das vesikuläre Transportprotein in katecholaminergen, serotoninergen und histaminergen Neuronen, VMAT-2, zeigte sich eine transiente Expression während der Entwicklung in den postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum (Abb. 4.9, E-H). Die grösste Anzahl VMAT-2-positiver Neurone wurde mit über 90% im embryonalen Stadium beobachtet (Abb. 4.9, E). Postnatal erfolgte eine kontinuierliche quantitative Abnahme der VMAT-2-positiven Neurone. Es waren deutliche Unterschiede in der Reaktionsstärke zwischen den Neuronen festzustellen. Im adulten Stadium waren nur noch selten vereinzelte, sehr schwach VMAT-2-positive Neurone zu sehen (Abb. 4.9, H). Vor allem in den späten Entwicklungsstadien waren zahlreiche VMAT-2-positive Fasern zu sehen, die auch an VMAT-2-negative postganglionäre Neurone des Ganglion sphenopalatinum heranreichten. VMAT-1-Expression war zu keinem Zeitpunkt während der Entwicklung in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion sphenopalatinum zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

VGLUT: Zur Untersuchung eines möglichen glutamatergen Phänotyps in den postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum wurde die Immunreaktivität für VGLUT-1 bis -3, die etablierten Marker für glutamaterge

Neurone, getestet. Es zeigte jedoch keiner der drei Isotypen des vesikulären Glutamattransporters positive Reaktionen in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion sphenopalatinum (Daten nicht gezeigt).

4.2.2 Biogene Enzyme

TH: Die transiente Expression von VMAT-2 liess die Existenz eines, zumindest ebenfalls transienten, katecholaminergen Phänotyps in den postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum vermuten. Um dies zu untersuchen wurde die Immunreaktivität für TH, dem ratenlimitierenden Enzym in der Katecholaminbiosynthese im Ganglion sphenopalatinum getestet. TH-Immunreatktivität war während der gesamten Entwicklung permanent nur in singulären Neuronen zu beobachten, die aber meist stark TH-positiv waren (Abb. 4.9, I-L). Um den zweiten postnatalen Tag konnte ein vorübergehender leichter Anstieg der Zahl TH-positiver Neurone festgestellt werden. In den singulären TH-positiven Neuronen im adulten Stadium koexistierte teilweise DBH. Ebenso war eine Koexistenz von TH und DBH in vereinzelten Fasern innerhalb des Ganglion sphenopalatinum zu sehen (Abb. 4.16, J-L). Eine Koexistenz von TH und VMAT-2 in Fasern innerhalb des Ganglion sphenopalatinum im adulten Stadium war nicht festzustellen (Abb. 4.16, D-F). Es waren während der gesamten Entwicklung zahlreiche TH-positive präganglionäre Fasern im Ganglion sphenopalatinum vorhanden.
Es konnten während der Entwicklung zahlreiche SIF Zellen im Ganglion sphenopalatinum beobachtet werden, die sich durch intensive TH-Immunreaktivität und ihre geringere Grösse im Verhältnis zu den postganglionären Neuronen auszeichneten (Abb. 4.9, L).

AADC: Das Enzym AADC, das sowohl in der Dopaminsynthese, als auch in der Serotoninsynthese vorkommt, wurde überraschenderweise permanent in einer grossen Population der postganglionären Neurone des Ganglion sphenopalatinum gefunden (Abb. 4.10, A-D). Die Expression von AADC zeigte eine leichten Aufwärtstrend während der Entwicklung. Die Anzahl AADC-positiver Neurone im Ganglion sphenopalatinum stieg von 60% im embryonalen Stadium auf 75% im adulten Stadium an. Die Reaktionsstärke der Neurone variierte teilweise beträchtlich.

Adult waren regionale Verteilungsunterschiede der reaktionspositiven Neurone innerhalb des Ganglions zu sehen. Die Mehrzahl der AADC-positiven Neurone war mit den AADC-positiven Fasern assoziiert (Abb. 4.10, D). Die Koexistenz von AADC in einer Subpopulation VAChT-positiver Neurone ist mittels der Fluoreszenz-Doppelmarkierung in Abb. 4.15, A-C dargestellt. In den neuronalen Zellkörpern des Ganglion sphenopalatinum im adulten Stadium fiel eine eher in der Zirkumferenz der Neurone gelegene Verteilung der AADC-Immunreaktion auf (Abb. 4.15, B). Eine Koexpression von AADC und VMAT-2 konnte im adulten Stadium weder in den Neuronen, noch in Fasern festgestellt werden (Abb. 4.16, G-I). AADC-positive Fasern waren während der gesamten Entwicklung in grösserer Zahl im Ganglion sphenopalatinum zu beobachten.
Die Expression von AADC in den postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum liess sowohl die Existenz eines dopaminergen, als auch eines serotoninergen Phänotyps vermuten.

DBH: Um einen möglichen noradrenergen Phänotyp in den postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum zu untersuchen, wurde die Immunreaktivität für Dopamin-ß-Hydroxylase, das für die Umwandlung von Dopamin zu Noradrenalin verantwortlich ist, getestet. Es zeigte sich eine permanente und konstante Expression von DBH in über 90% der neuronalen Zellkörper des Ganglion sphenopalatinum während der Entwicklung (Abb. 4.9, M-P). Die Unterschiede in der Reaktionsstärke zwischen den Neuronen waren vor allem in den frühen Entwicklungsstadien zum Teil sehr gross. Innerhalb der Neurone selbst war eine panzelluläre Verteilung der DBH-Immunreaktionen zu sehen (Abb. 4.15, E). DBH koexistierte im grössten Teil der Neurone mit VAChT (Abb. 4.15, D-F). In vereinzelten Fasern, wie auch in singulären Neuronen koexistierte DBH mit TH (Abb. 4.16, J-L). Die DBH-Expression war insgesamt eher in einer spärlichen Anzahl von Fasern innerhalb des Ganglion sphenopalatinum zu beobachten.
Aufgrund der Expression von DBH in den postganglionären Neuronen des Ganglion oticum war die Evidenz für die Existenz eines noradrenergen Phänotyps gegeben.

PNMT: Das Enzym für den letzten Reaktionsschritt in der Katecholaminsynthese, Phenylethanolamin-*N*-Methyltransferase, war zu keinem Zeitpunkt während der Entwicklung in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion sphenopalatinum zu

beobachten (Daten nicht gezeigt). Somit gab es keinen Anhaltspunkt für die Existenz eines adrenergen Phänotyps.

TpH: Das Enzym Tryptophan-Hydroxylase, das den ersten Reaktionsschritt der Serotoninsynthese katalysiert und spezifisch für serotoninerge Neurone ist, konnte zu keinem Zeitpunkt während der Entwicklung in den postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Auch der Serotonin-Membrantransporter (SERT), sowie Serotonin selbst (5-HT) waren negativ in den Neuronen (Daten nicht gezeigt). Damit war Evidenz für die Existenz eines serotoninergen Phänotyps nicht gegeben.

HDC: Um auch die Möglichkeit eines histaminergen Phänotyps auszuloten, dessen Existenz aufgrund der transienten Expression von VMAT-2 in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion sphenopalatinum zu vermuten war, wurde die Expression des Enzyms Histidin-Decarboxylase untersucht, das den einzigen Reaktionsschritt in der Histaminsynthese katalysiert und obligat für histaminerge Neurone ist. Dabei zeigte sich erstaunlicherweise eine permanente Expression von HDC in den Neuronen mit einem deutlichen Aufwärtstrend insgesamt während der Entwicklung (Abb. 4.10, E-H). Die Expression von HDC zeigte kurz nach der Geburt eine vorübergehende Abnahme von 35% positive Neurone im embryonalen Stadium auf 10% positive Neurone am zweiten postnatalen Tag (Abb. 4.10, E und F). Anschliessend stieg die Anzahl der HDC-positiven Neurone bis auf 60% im adulten Stadium an (Abb. 4.10, H). Die Stärke der HDC-Expression zwischen den einzelnen Neuronen differierte teilweise beträchtlich. Die Koexistenz von HDC in der Hauptpopulation der VAChT-positiven postganglionären Neurone im adulten Stadium ist mittels Fluoreszenz-Doppelmarkierung in Abb. 4.15, G-I dargestellt. Hierbei zeigte sich eine eher perimetrische Verteilung der HDC-Immunreaktionen innerhalb der Neurone. Eine grössere Anzahl Fasern im Ganglion sphenopalatinum zeigten ebenfalls HDC-Immunreaktivität. Es waren auch zahlreiche HDC-positive Mastzellen zu sehen (Abb. 4.10, H).

4.2.3 Neuropeptide und Chromogranin A

VIP: Der cholinerge Kotransmitter VIP aus der Sekretin/Glukagon-Familie konnte permanent und konstant in der Hauptpopulation der postganglionären Neurone des Ganglion sphenopalatinum (über 99%) während der gesamten Entwicklung beobachtet werden (Abb. 4.11, A-D). Nur vereinzelt waren singuläre VIP-negative Neurone zu sehen (Ab.. 4.11, D). Die Reaktionsstärke von VIP in den Neuronen war sehr hoch und zeigte insgesamt nur wenig Unterschiede zwischen den Neuronen. Auch zahlreiche prä- und postganglionäre Fasern innerhalb des Ganglion sphenopalatinum waren VIP-positiv.

NPY: Der noradrenerge Kotransmitter NPY war permanent mit einer tendentiellen Zunahme während der Entwicklung in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion sphenopalatinum exprimiert (Abb. 4.11, M-P). Die Expression von NPY stieg von 15% positive Neurone im embryonalen Stadium auf etwa 50% positive Neurone im adulten Stadium. Die Reaktionsstärke von NPY in den Neuronen nahm während der Entwicklung zu. NPY koexistierte im adulten Stadium in einer Subpopulation der Neurone mit VAChT (Abb. 4.16, A-C). Fasern innerhalb des Ganglion sphenopalatinum zeigten ebenfalls NPY-Immunreaktivität.

CGRP: Das in sensorischen Neuronen vorkommende Neuropeptid CGRP war überraschenderweise permanent mit einer Tendenz zur Abnahme während der Entwicklung in einer grossen Population der neuronalen Zellkörper des Ganglion sphenopalatinum exprimiert (Abb. 4.11, I-L). Die grösste Anzahl CGRP-positiver Neurone wurde mit etwa 90% im embryonalen Stadium gefunden. Postnatal verringerte sich die Anzahl positiver CGRP-Neurone sukzessive auf 40% im adulten Stadium. Der Unterschied der Reaktionsstärke zwischen den Neuronen war teilweise sehr gross. Die Immunreaktionen für CGRP innerhalb der Neurone zeigten sich hauptächlich in der Zirkumferenz (Abb. 4.15, K). Im adulten Stadium koexistierte CGRP in einer Subpopulation der Neurone mit VAChT (Abb. 4.15, J-L). CGRP-Immunreaktivität zeigte sich auch in einer grossen Anzahl Fasern im Ganglion sphenopalatinum.

MERGL: Die Expression des Proopioidderivates MERGL zeigte während der Entwicklung eine Zunahme in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion sphenopalatinum von 10% positive Neurone embryonal auf 40% positive Neurone im adulten Stadium (Abb. 4.10, M-P). Die Intensität der MERGL-Immunreaktion war insgesamt hoch. Es waren aber auch schwach MERGL-positive Neurone zu sehen. Bisweilen waren starke MERGL-Immunreaktionen in Fasern im Ganglion sphenopalatinum zu beobachten, die auch teilweise Kontakte mit MERGL-negativen Neuronen eingingen (Abb. 4.10, O und P).

SP: Die Expression des Präprotachykinins SP in den postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum zeigte eine starke Abnahme während der Entwicklung (Abb. 4.11, E-H). Embryonal waren ca. 80% SP-positive Neurone zu beobachten, im adulten Stadium hingegen nur noch 20% SP-positive Neurone. Die Unterschiede in der Reaktionsstärke zwischen den Neuronen waren eher gering. SP-positive Fasern waren in grösserer Anzahl im Ganglion sphenopalatinum zu sehen und gingen zahlreiche Kontakte sowohl mit SP-positiven, als auch mit SP-negativen Neuronen ein (Abb. 4.11, H).

CgA: Um die vesikuläre Ausstattung der postganglionären Neurone des Ganglion sphenopalatinum insgesamt darzustellen, wurde die Immunreaktivität des obligaten Vesikulogens CgA untersucht. Dabei zeigte sich CgA-Expression in etwa 98% der Neurone permanent während der Entwicklung (Abb. 4.10, I-L). Teilweise konnten singuläre CgA-negative Neurone beobachtet werden (Abb. 4.10, L). Die Intensität der Immunreaktion nahm während der Entwicklung bis zum adulten Stadium in den meisten Neuronen erheblich ab. Nur vereinzelt waren CgA-positive Fasern innerhalb des Ganglion sphenopalatinum zu sehen.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.12 – 4.14 graphisch dargestellt und in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

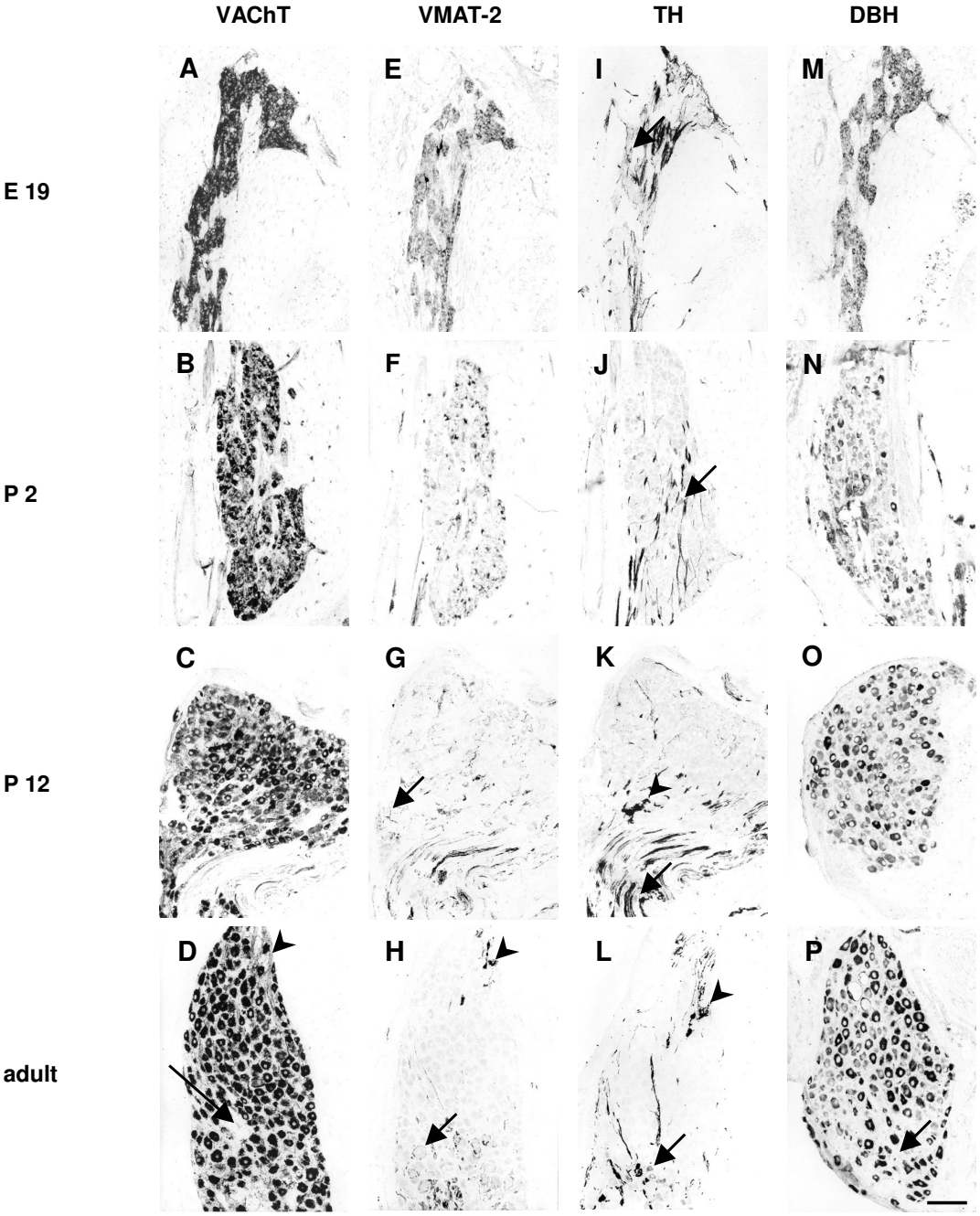

Abbildung 4.9: DAB/Nickel-Immunhistochemie für VAChT, VMAT-2, TH und DBH im Ganglion sphenopalatinum über die Entwicklung

Konstant hohe Expression von VAChT (Bild A-D) und DBH (Bild M-P), Pfeile in D und P weisen exemplarisch auf reaktionsnegative Neurone, Pfeilkopf in D weist auf VAChT-negative SIF Zellen. Deutliche Abnahme der VMAT-2-Expression (Bild E-H), Pfeile in G und H weisen auf Fasern, die die Neurone umgeben; Pfeilkopf in H weist auf VMAT-2-positive SIF-Zellen. TH-Expression während der Entwicklung nur in einer Subpopulation der Neurone (Pfeile in Bild I-L), Pfeilkopf in L weist auf TH-positive SIF Zellen. Skalabalken in P für Bild A-P = 50 µm

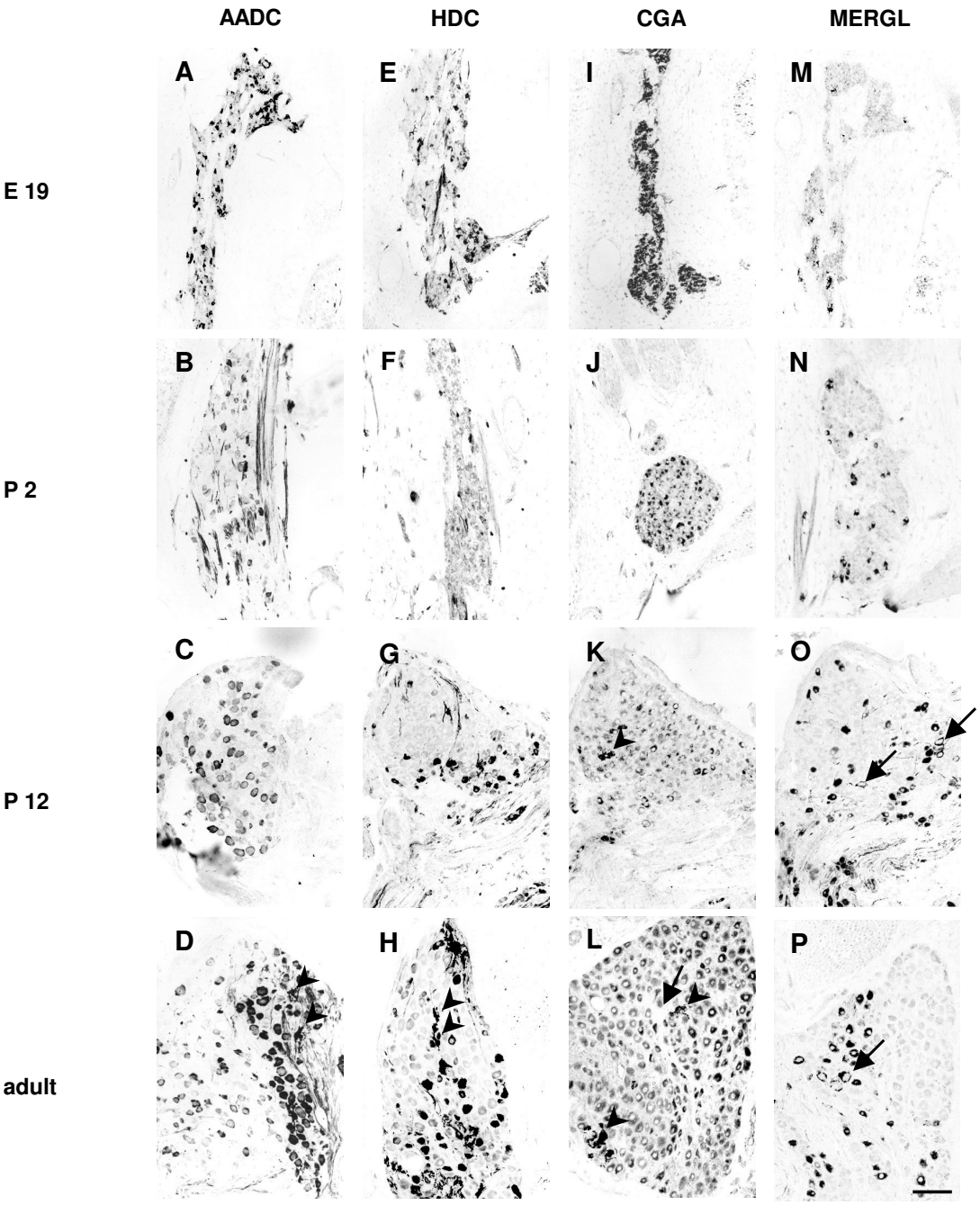

Abbildung 4.10: DAB/Nickel-Immunhistochemie für AADC, HDC, CgA und MERGL im Ganglion sphenopalatinum über die Entwicklung

Leichte Zunahme der Expression von AADC (Bild A-D), adult Gruppierung des Grossteils der reaktionspositiven Neurone entlang der präganglionären Fasern; Pfeilköpfe in D weisen auf AADC-positive SIF Zellen. Abnahme der HDC-Expression nach der Geburt und Wiederanstieg im Verlauf der Entwicklung (Bild E-H); Pfeilköpfe in H weisen auf HDC-positive Mastzellen. Gleichbleibend hohe Expression von GgA (Bild I-L) unterschiedlicher Expressionsstärke; Pfeilköpfe in K und L weisen auf CgA-positive SIF Zellen, Pfeil in L auf CgA-negatives Neuron. Zunahme der Expression von MERGL (Bild M-P), teilweise mit starken Reaktionen in Fasern an reaktionsegativen Neuronen (Pfeile in O und P). Skalabalken in P für Bild A-P = 50 µm

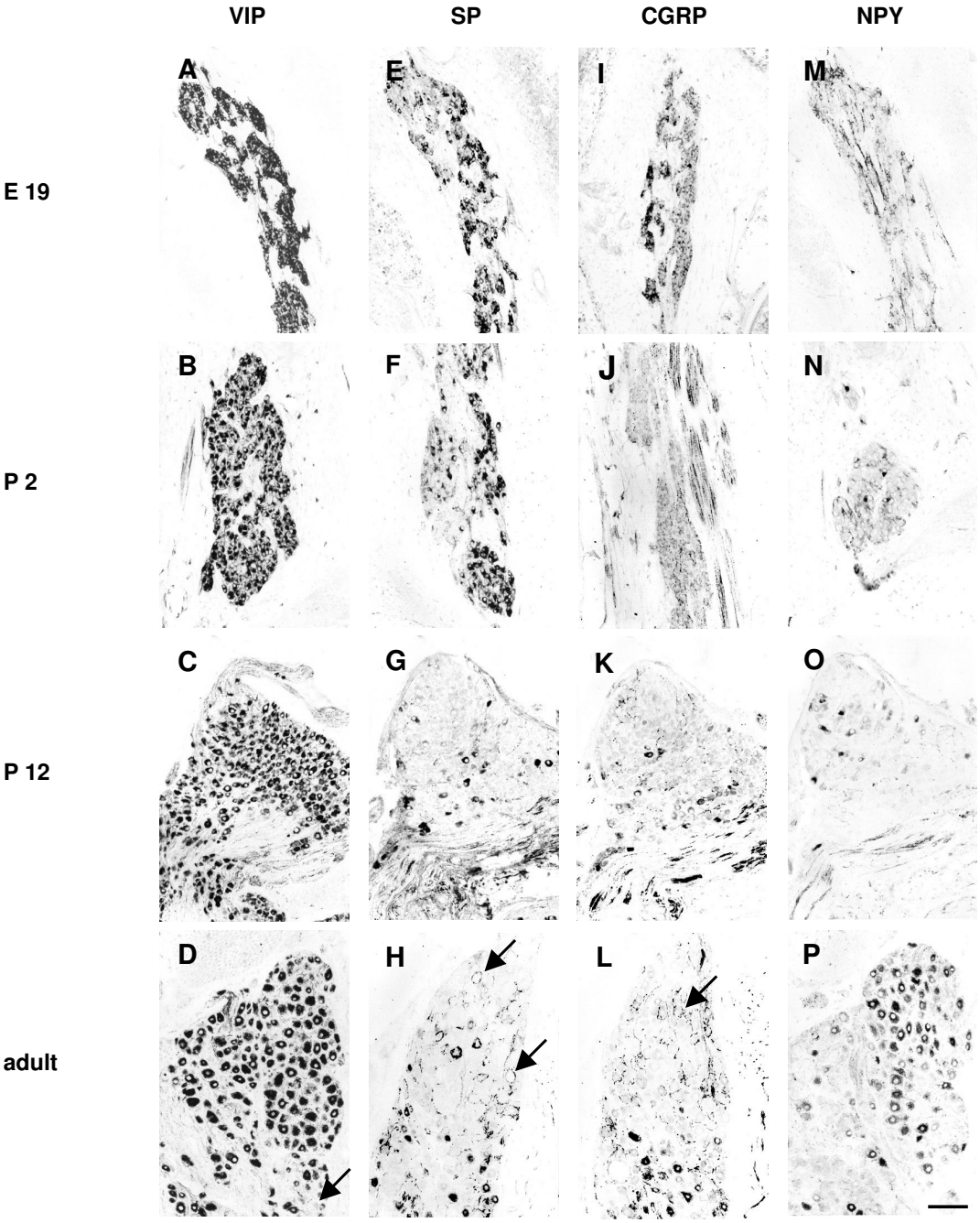

Abbildung 4.11: DAB/Nickel-Immunhistochemie für VIP, SP, CGRP und NPY im Ganglion sphenopalatinum über die Entwicklung

Konstant hohe Expression von VIP (Bilder A-D) mit singulären reaktionsnegativen Neuronen (Pfeil in D). Deutliche Abnahme der Expression von SP (Bild E-H); Pfeile in H weisen auf SP-positive Fasern an SP-negativen Neuronen. Deutliche Abnahme der Expression von CGRP während der Entwicklung (Bild J-L); Pfeil in L weist exemplarisch auf CGRP-positive Faser. Zunahme der Expression von NPY (Bild M-P). Skalabalken in P für Bild A-P = 50 µm

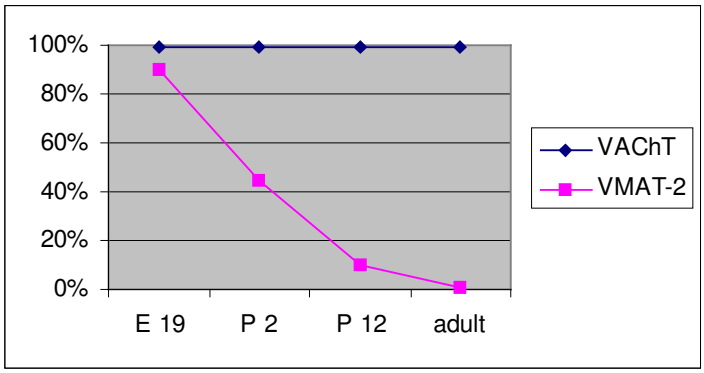

Abbildung 4.12: Verlauf der Expression von VAChT und VMAT-2 in den Neuronen des Ganglion sphenopalatinum während der Entwicklung

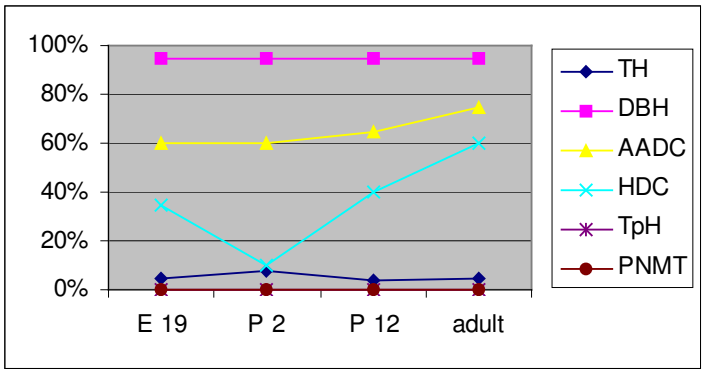

Abbildung 4.13: Verlauf der Expression von TH, DBH, AADC, HDC, TpH und PNMT in den Neuronen des Ganglion sphenopalatinum während der Entwicklung

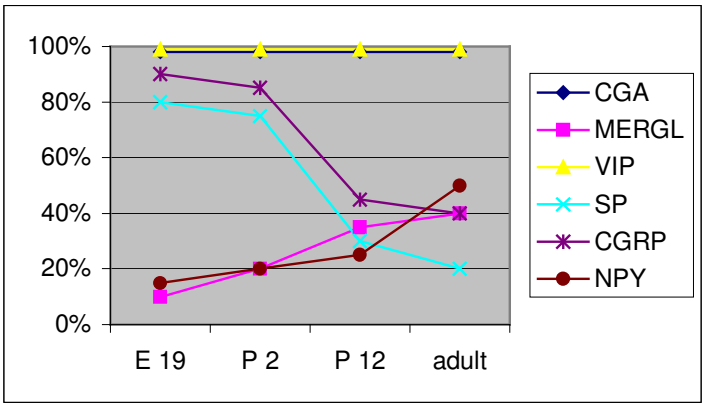

Abbildung 4.14: Verlauf der Expression von CgA, MERGL, VIP,SP, CGRP und NPY in den Neuronen des Ganglion sphenopalatinum während der Entwicklung

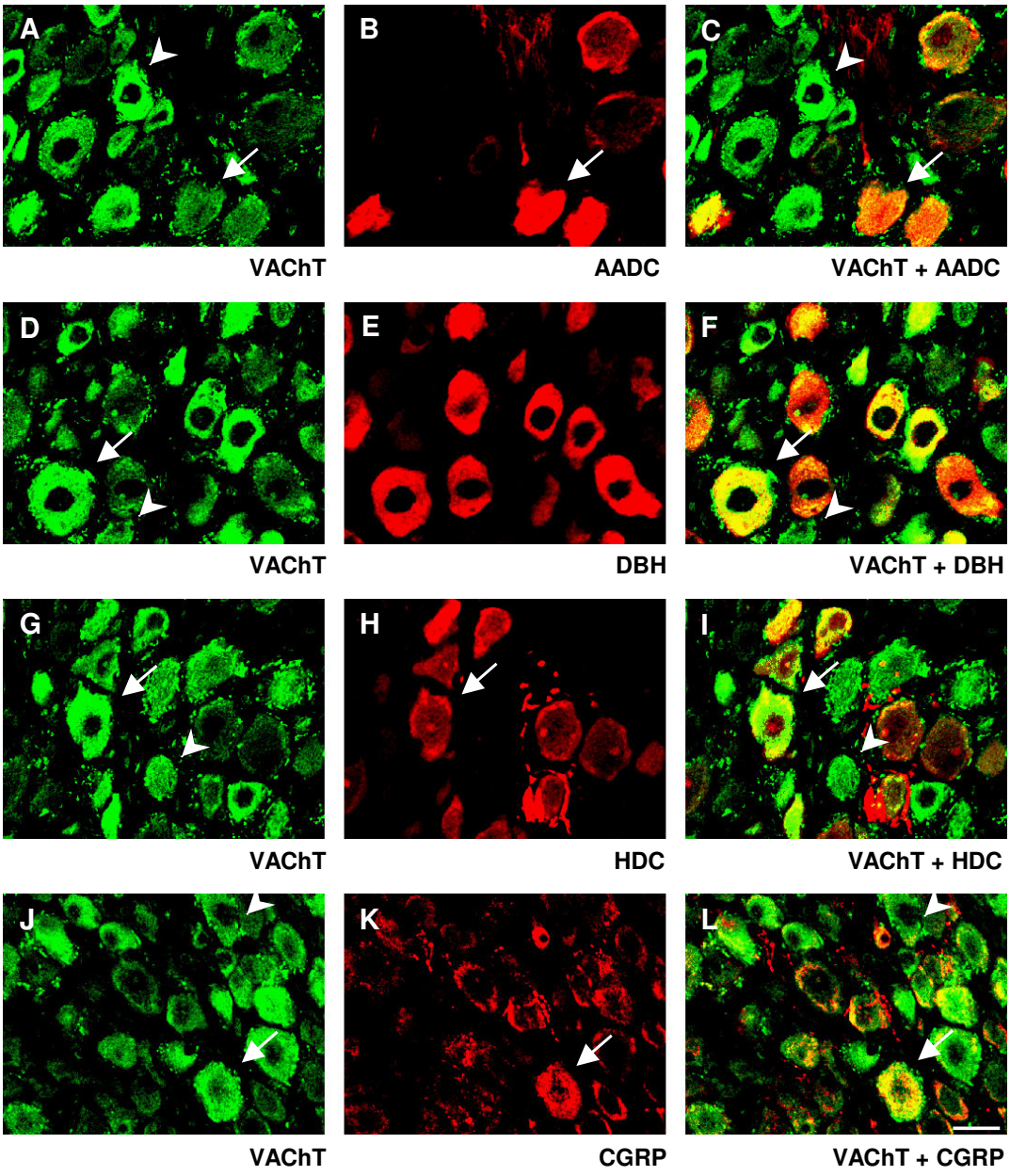

Abbildung 4.15: Fluoreszenz-Doppelmarkierung für VAChT gegen AADC, DBH, HDC und CGRP im adulten Ganglion sphenopalatinum

Koexistenz von VAChT mit AADC (Bild A-C), DBH (Bild D-F), HDC (Bild G-I) und CGRP (Bild J-L) jeweils in der Hauptpopulation der Neurone. Die Pfeile weisen jeweils auf kopositive Neurone, die Pfeilköpfe weisen jeweils auf nicht-kopositive Neurone. Man beachte die eher perimetrische Verteilung der Immunreaktivität von AADC in B, HDC in H und CGRP in K innerhalb der Neurone. Skalabalken in L für Bild A-L = 20µm

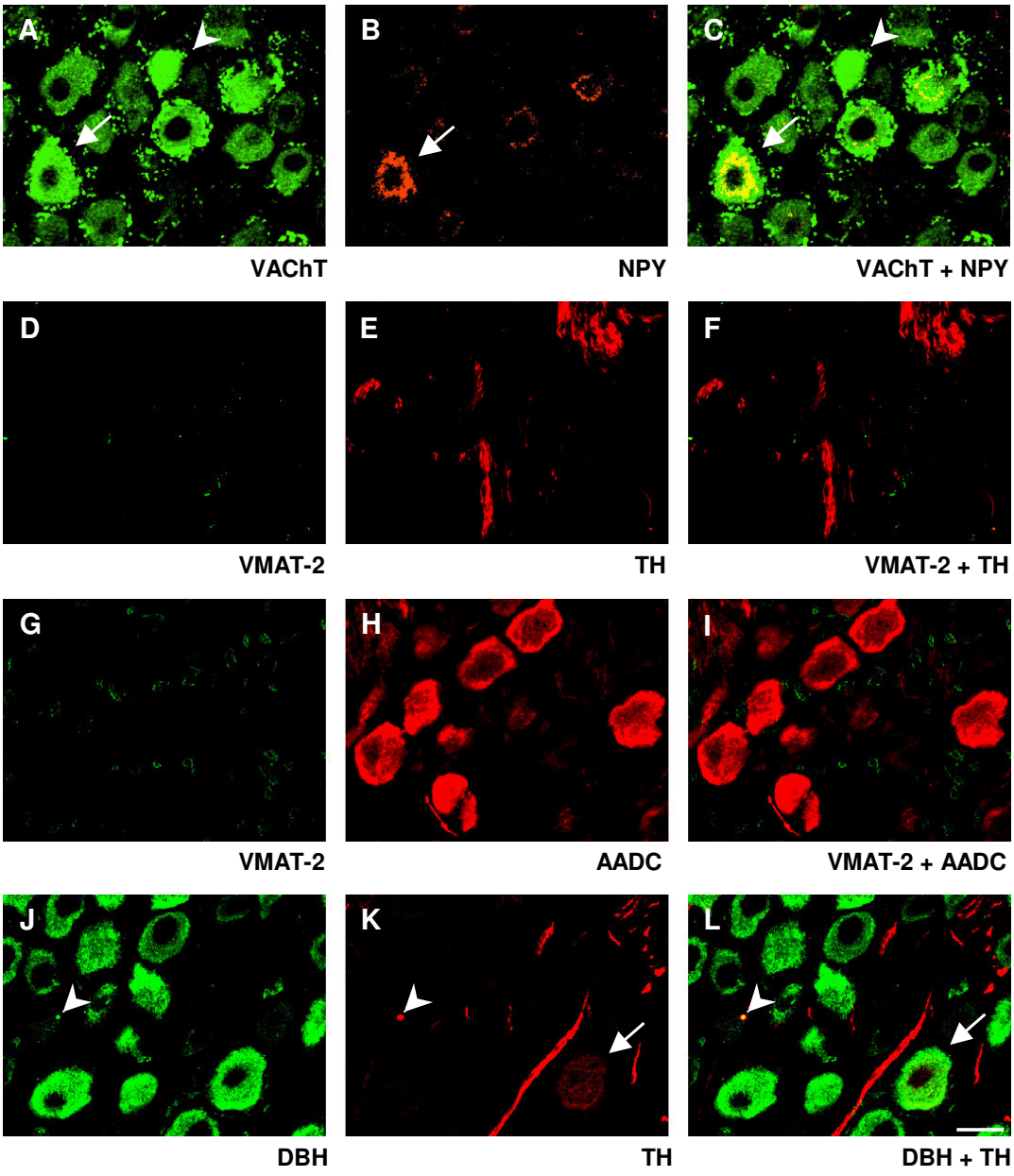

Abbildung 4.16: Fluoreszenz-Doppelmarkierung für VAChT gegen NPY, VMAT-2 gegen TH und AADC, sowie DBH gegen TH im adulten Ganglion sphenopalatinum

Koexistenz von VAChT und NPY in einer Supopulation der Neurone (Bild A-C); Pfeile weisen auf kopositive Neurone, Pfeilköpfe weisen auf nicht-kopositive Neurone. Keine Koexistenz von VMAT-2 mit TH (Bild D-F), bzw. AADC (Bild G-I) in den Neuronen. Vereinzelte DBH/TH-kopositive Fasern (Pfeilköpfe in Bild J-L) und schwache Koexistenz von DBH und TH in singulären Neuronen (Pfeile in K und L). Skalabalken in L für Bild A-L = 20µm

4.3 Ganglion submandibulare

4.3.1 Vesikuläre Transportproteine

VAChT: Das vesikuläre Transportprotein für Acetylcholin in cholinergen Neuronen, VAChT, war permanent während der Entwicklung in der Hauptpopulation (über 99%) der neuronalen Zellkörper des Ganglion submandibulare exprimiert (Abb. 4.17, A-D). Nur vereinzelt waren singuläre VAChT-negative Neurone zu sehen (Abb. 4.17, C). Die Reaktionsstärke war konstant hoch und zeigte nur geringfügige Unterschiede zwischen den Neuronen. Zu allen Entwicklungsstadien war eine grosse Anzahl VAChT-positiver prä- und postganglionärer Fasern zu beobachten.

VMAT-2: Das vesikuläre Transportprotein in katecholaminergen, serotoninergen und histaminergen Neuronen, VMAT-2, zeigte in den postganglionären Neuronen des Ganglion submandibulare eine transiente Expression während der Entwicklung (Abb. 4.17, E-H). Embryonal war VMAT-2-Immunreaktivität in über 90% der Neurone zu beobachten. Postnatal nahm diese Anzahl stetig ab. Vor allem in den frühen postnatalen Stadien waren die VMAT-2-positiven Neurone im Ganglion submandibulare in kleinen Zellpopulationen gruppiert zu beobachen (Abb. 4.17, F). Im adulten Stadium waren nur noch sehr selten vereinzelte, schwach VMAT-2-positive Neurone zu sehen (Abb. 4.17, H). Die Reaktionsstärke zeigte Unterschiede zwischen den Neuronen, war aber insgesamt eher schwach. VMAT-2-positive Fasern waren während der gesamten Entwicklung im Ganglion submandibulare nur spärlich vorhanden. Expression von VMAT-1 war zu keinem Zeitpunkt während der Entwicklung in den postganglionären Neuronen des Ganglion submandibulare zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

VGLUT: Ein glutamaterger Phänotyp konnte in den postganglionären Neuronen des Ganglion submandibulare so gut wie ausgeschlossen werden, da keiner der drei Isotypen des vesikulären Transportproteins für Glutamat, VGLUT-1 bis –3, die etablierte Marker für glutamaterge Neurone sind, während der Entwicklung in den Neuronen exprimiert war (Daten nicht gezeigt).

4.3.2 Biogene Enzyme

TH: Um einen möglichen katecholaminergen Phänotyp in den postganglionären Neuronen des Ganglion submandibulare zu untersuchen, wurden die Neurone auf die Expression von TH, dem ratenlimitierenden Enzym der Katecholaminsynthese getestet. Es zeigte sich, dass TH während der gesamten Entwicklung nur in wenigen, singulär auftretenden Neuronen exprimiert war (Abb. 4.17, I-L). In diesen Neuronen war die Immunreaktivität für TH meist sehr stark. TH-positive Fasern waren während der Entwicklung nur in geringer Anzahl im Ganglion submandibulare zu beobachten. In einigen TH-positiven Fasern im adulten Stadium koexistierte VMAT-2 (Abb. 4.24, G-I). DBH war hingegen nicht in den TH-positiven Fasern im Ganglion submandibulare im adulten Stadium zu sehen (Abb. 4.24, J-L).

AADC: Zur Untersuchung eines möglichen dopaminergen, bzw. serotoninergen Phänotyps in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion submandibulare wurde die Immunreaktivität von AADC getestet. Überraschenderweise zeigte sich eine permanente AADC-Expression mit einer deutlichen Zunahme während der Entwicklung (Abb. 4.18, A-D). Die Expression von AADC in den postganglionären Neuronen des Ganglion submandibulare stieg von 10% positive Neurone embryonal auf über 90% positive Neurone im adulten Stadium. Die Reaktionsstärke für AADC zeigte teilweise grosse Unterschiede zwischen den Neuronen. AADC war in den meisten VAChT-positiven Neuronen im adulten Stadium koexprimiert, was mittels der Fluoreszenz-Doppelmarkierung dargestellt ist (Abb. 4.23, A-C). Hierbei zeigte sich eine eher perimetrische Verteilung der AADC-Immunreaktionen innerhalb der Neurone des Ganglion submandibulare (Abb. 4.23, B). AADC-positive präganglionäre Fasern konnten hauptsächlich im adulten Stadium beobachtet werden (Abb. 4.18, D).
Der Nachweis der AADC-Expression in den postganglionären Neuronen des Ganglion submandibulare liess die Existenz sowohl eines dopaminergen, als auch eines serotoninergen Phänotyps vermuten.

DBH: Die Immunreaktivität von DBH, dem Enzym, das die Umwandlung von Dopamin zu Noradrenalin katalysiert, wurde zur Untersuchung eines möglichen noradrenergen Phänotyps in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion

submandibulare getestet. Hierbei zeigte sich eine permanent hohe Expression von DBH in den Neuronen (über 90%) während der gesamten Entwicklung (Abb. 4.17, M-P). Die Reaktionsstärke von DBH in den Neuronen nahm während der Entwicklung deutlich zu und zeigte teilweise grosse Unterschiede zwischen den Neuronen. Die Koexistenz von DBH mit VAChT in der Hauptpopulation der Neurone wurde im adulten Stadium mittels Fluoreszenz-Doppelmarkierung dargestellt (Abb. 4.23, D-F). DBH-positive präganglionäre Fasern konnten nur selten im Ganglion submandibulare beobachtet werden.

PNMT: Das Enzym PNMT, das die Umwandlung von Noradrenalin zu Adrenalin katalysiert, war zu keinem Zeitpunkt während der Entwicklung in den postganglionären Neuronen des Ganglion submandibulare zu sehen (Daten nicht gezeigt). Somit war kein Anhaltspunkt für die Existenz eines adrenergen Phänotyps gegeben.

TpH: Die Expression von TpH, dem für serotoninerge Neurone spezifischen Enzym, konnte zu keinem Zeitpunkt während der Entwicklung in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion submandibulare nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das gleiche galt für den Serotonin-Membrantransporter (SERT) und für Serotonin selbst (5-HT) (Daten nicht gezeigt). Damit war keine Evidenz für die Existenz eines serotoninergen Phänotyps in den postganglionären Neuronen des Ganglion submandibulare gegeben.

HDC: Zur Untersuchung eines histaminergen Phänotyps in den postganglionären Neuronen des Ganglion submandibulare wurde die Immunreaktivität von HDC, dem Enzym, das die Umwandlung von Histidin zu Histamin katalysiert, getestet. Dabei war eine permanente Expression von HDC in den Neuronen mit einer deutlichen Zunahme während der Entwicklung zu beobachten (Abb. 4.18, E-H). Kurz nach der Geburt war eine vorübergehende Abnahme der HDC-Expression festzustellen. Die Anzahl der HDC-positiven Neurone sank von 25% embryonal auf ca. 10% am zweiten postnatalen Tag (Abb. 4.18, E und F). Anschliessend stieg die Anzahl der HDC-positiven Neurone auf 90% im adulten Stadium an (Abb. 4.18, H). Die Reaktionsstärke von HDC in den Neuronen nahm während der Entwicklung insgesamt zu. HDC koexistierte im adulten Stadium in den meisten postganglionären

Neuronen des Ganglion submandibulare mit VAChT (Abb. 4.23, G-I). Es war eine eher perimetrische Verteilung der HDC-Immunreaktion innerhalb der Neurone zu beobachten (Abb. 4.23, H). HDC-positive Fasern innerhalb des Ganglion submandibulare waren vor allem im adulten Stadium in grösserer Anzahl zu sehen. In den frühen Entwicklungsstadien war nur eine spärliche Zahl HDC-positiver Fasern zu beobachten. HDC-Immunreaktivität war in zahlreichen Mastzellen deutlich zu sehen (Abb. 4.18, F).

4.3.3 Neuropeptide und Chromogranin A

VIP: Die Expression des cholinergen Kotransmitters VIP zeigte überraschenderweise eine deutliche Abnahme in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion submandibulare während der Entwicklung (Abb. 4.19, A-D). Die Anzahl der VIP-positiven Neurone verringerte sich sukzessive von 95% embryonal auf 35% im adulten Stadium. VIP koexistierte im adulten Stadium nur noch in einer kleinen Subpopulation der Neurone mit VAChT, was mittels Fluoreszenz-Doppelmarkierung in Abb. 4.24, D-F dargestellt ist. Die Reaktionsstärke von VIP in den Neuronen nahm während der Entwicklung insgesamt ab. VIP-positive prä- und postganglionäre Fasern waren im Ganglion submandibulare zahlreich vorhanden.

NPY: Einen leichten Aufwärtstrend über die prä- und postnatale Entwicklung zeigte die Expression des noradrenergen Kotransmitters NPY in den postganglionären Neuronen des Ganglion submandibulare (Abb. 4.19, M-P). Die Anzahl der NPY-positiven Neurone stieg von 5% im embryonalen Stadium auf 35% im adulten Stadium an. Die Koexistenz von NPY in einer Subpopulation der Neurone mit VAChT im adulten Stadium ist mittels Fluoreszenz-Doppelmarkierung in Abb. 4.24, A-C dargestellt. Die Reaktionsstärke in den Neuronen war meist schwach, nahm aber insgesamt während der Entwicklung zu. NPY-positive präganglionäre Fasern waren in grösserer Anzahl vor allem in den frühen Entwicklungsstadien im Ganglion sphenopalatinum zu sehen.

CGRP: Einen leichten Trend zur Abnahme während der Entwicklung zeigte die Expression des in sensorischen Neuronen vorkommenden Neuropeptides CGRP in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion submandibulare (Abb. 4.19, I-L). Embryonal waren über 90% der Neurone des Ganglion submandibulare CGRP-

positiv. Postnatal nahm diese Zahl stetig ab. Im adulten Stadium waren nur noch 60% der Neurone des Ganglion submandibulare CGRP-positiv. Die Reaktionsstärke in den Neuronen war insgesamt meist schwach. Vor allem in den späten postnatalen Entwicklungsstadien waren sehr viele CGRP-positive Fasern im Ganglion submandibulare zu beobachten, die zahlreiche Kontakte mit den Neuronen eingingen (Ab. 4.19, K und L).

MERGL: Die Expression des Proopioidderivates MERGL zeigte sich permanent während der Entwicklung in der Hauptpopulation (95%) der postganglionären Neurone des Ganglion submandibulare (Abb. 4.18, M-P). Die Reaktionsstärke zeigte zum Teil grosse Unterschiede zwischen den einzelnen Neuronen. MERGL-positive Fasern waren ebenfalls in grösserer Anzahl im Ganglion submandibulare zu beobachten.

SP: Die Expression des Präprotachykinins SP war permanent während der Entwicklung in der überwiegenden Anzahl der postganglionären Neurone (99%) des Ganglion submandibulare zu sehen (Abb. 4.19, E-H). Auch die Reaktionsstärke von SP in den Neuronen war konstant hoch und zeigte nur geringe Unterschiede zwischen den Neuronen. SP koexistierte in fast allen Neuronen mit VAChT, was mittels Fluoreszenz-Doppelmarkierung dargestellt ist (Abb. 4.23, J-L). Innerhalb der Neurone zeigten die SP-Immunreaktionen eine eher perinukleäre Verteilung (Abb. 4.23, K). SP-positive Fasern waren ebenfalls in grosser Anzahl im Ganglion submandibulare zu sehen.

CgA: Zur Untersuchung der vesikulären Ausstattung der neuronalen Zellkörper des Ganglion submandibulare wurde die Immunreaktivität für CgA, einem obligaten Vesikulogen getestet. Hierbei zeigte sich eine permanente Expression für CgA während der Entwicklung in der überwiegenden Anzahl der Neurone (98%) (Abb. 4.18, I-L). Die Reaktionsstärke für CgA in den Neuronen nahm leicht ab. CgA-positive Fasern wurden im Ganglion submandibulare nicht beobachtet.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.20 – 4.22 graphisch dargestellt und in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

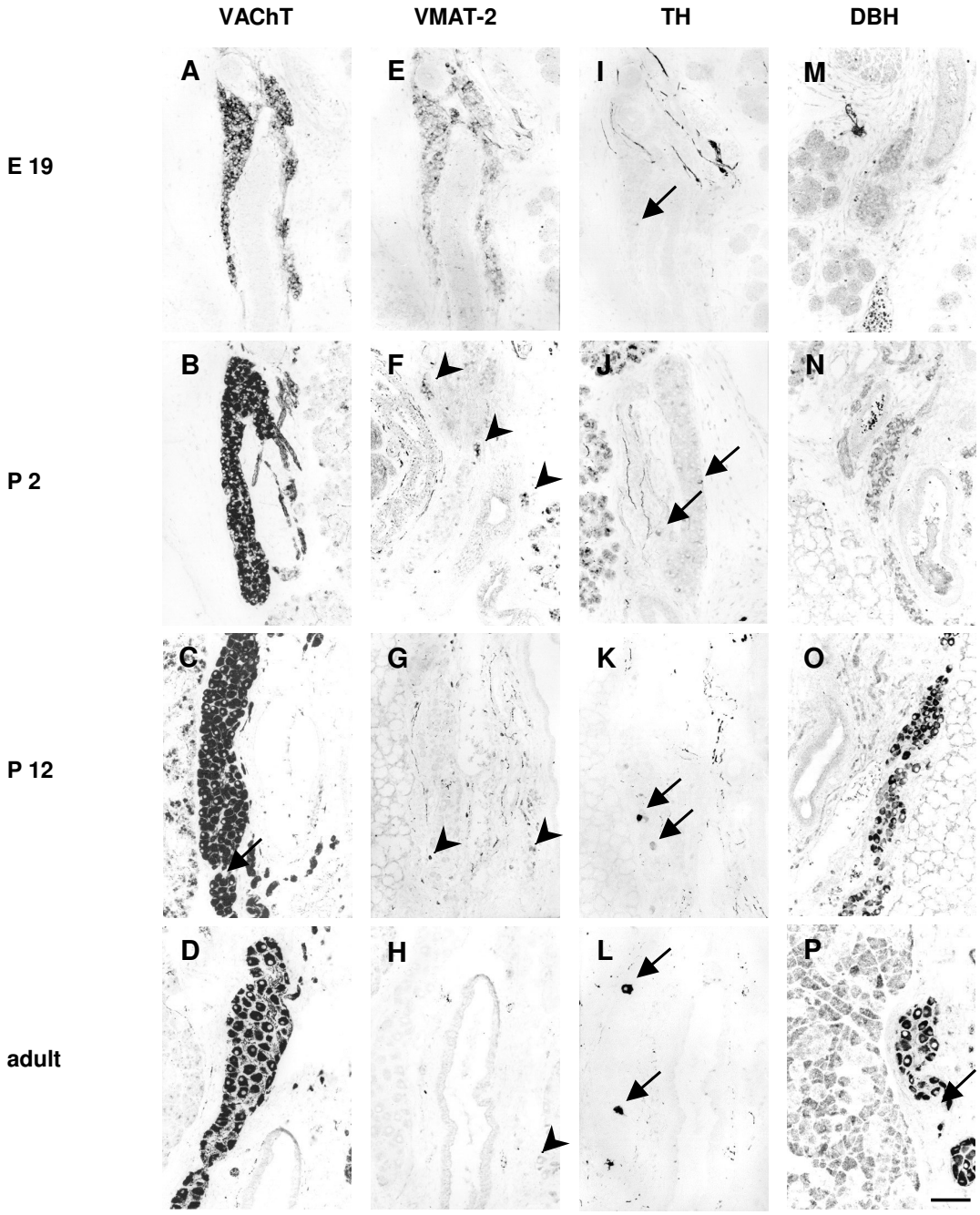

Abbildung 4.17: DAB/Nickel-Immunhistochemie für VAChT, VMAT-2, TH und DBH im Ganglion submandibulare über die Entwicklung

Konstant hohe Expression von VAChT (Bild A-D) mit einzeln auftretenden reaktionsnegativen Neuronen (Pfeil in C). Deutliche Abnahme der VMAT-2-Expression und dessen Reaktionsstärke (Bild E-H); Pfeilköpfe weisen auf VMAT-2-positive Neurone. TH-Expression in singulären Neuronen über sämtliche Entwicklungsstadien mit gleichzeitiger Zunahme der Reaktionsstärke (Bild I-L); Pfeile weisen auf TH-positive Neurone. Konstant hohe Expression von DBH mit deutlicher Zunahme der Reaktionsstärke (Bild M-P); Pfeil in P weist exemplarisch auf DBH-negatives Neuron. Skalabalken in P für Bild A-P = 50 µm

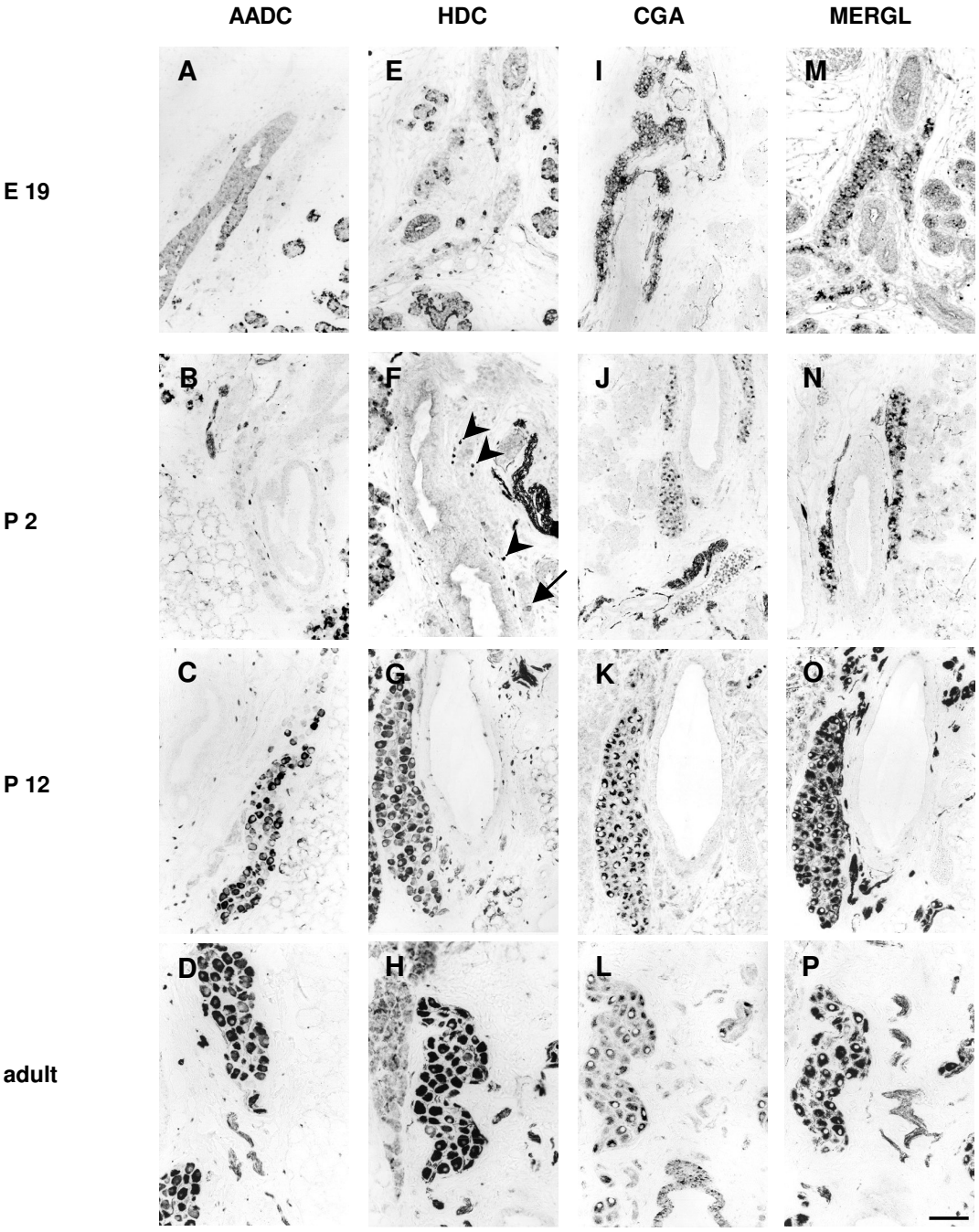

Abbildung 4.18: DAB/Nickel-Immunhistochemie für AADC, HDC, CgA und MERGL im Ganglion submandibulare über die Entwicklung

Deutliche Zunahme der Expression von AADC (Bild A-D). Insgesamt Zunahme der Expression von HDC mit kurzzeitiger Abnahme der Expression nach der Geburt (Bild E-H); Pfeil in F weist auf HDC-positives Neuron, Pfeilköpfe weisen auf HDC-positive Mastzellen. Konstant hohe Expression von CgA mit leichter Abnahme der Reaktionsstärke (Bild I-L). Konstant hohe Expression von MERGL mit unterschiedlicher Reaktionsstärke (Bild M-P). Skalabalken in P für Bild A-P = 50µm

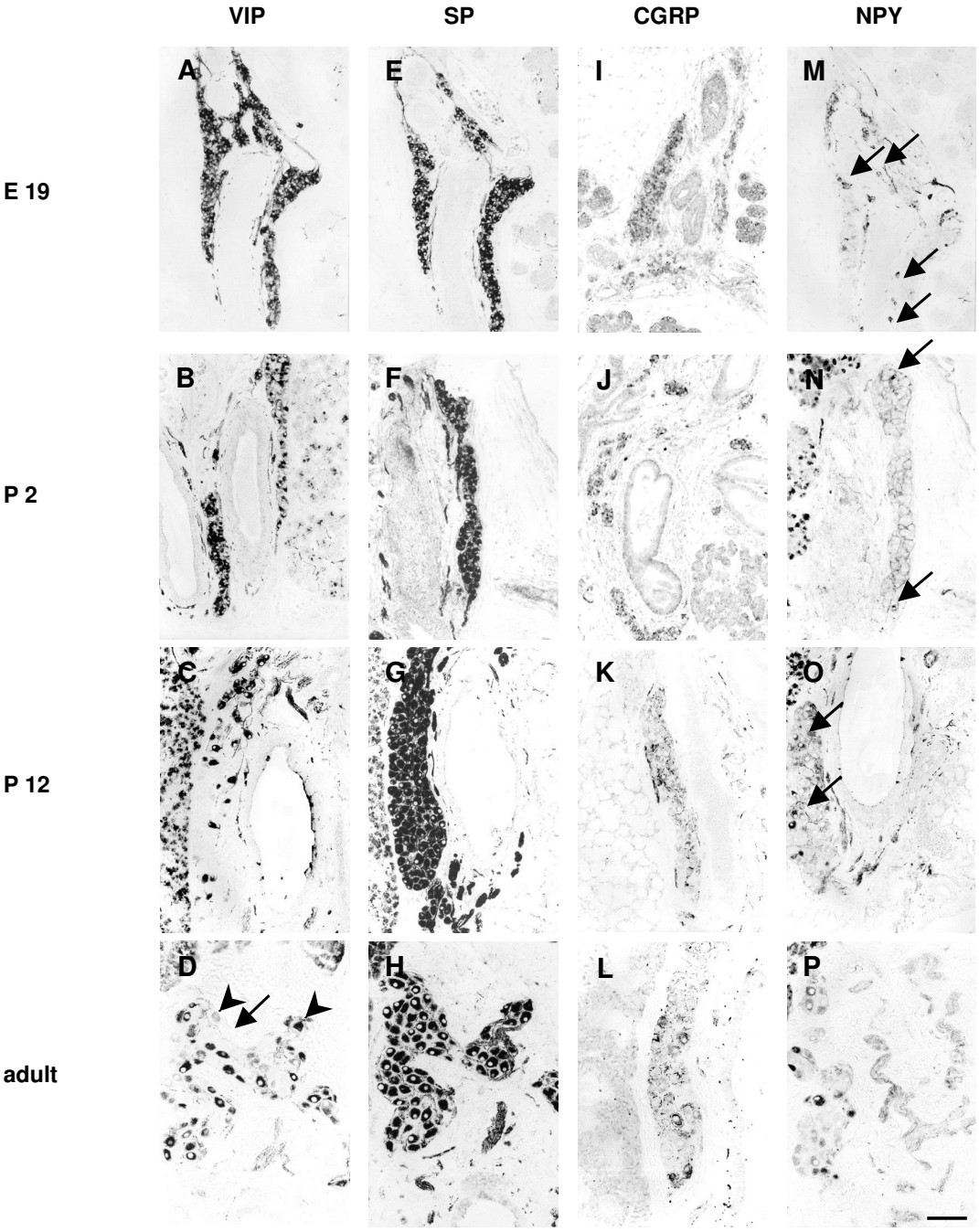

Abbildung 4.19: DAB/Nickel-Immunhistochemie für VIP, SP, CGRP und NPY im Ganglion submandibulare über die Entwicklung

Deutliche Abnahme der VIP-positiven Neurone (Bild A-D) und Abnahme der Reaktionsstärke von VIP; Pfeilköpfe in D weisen auf zwei VIP-positive Neurone unterschiedlicher Reaktionsstärke, Pfeil weist auf VIP-negative Neurone. Konstant hohe Expression von SP über die Entwicklung (Bild E-H). Abnahme der Expression von CGRP (Bild I-L). Leichte Zunahme der Expression von NPY in den Neuronen (Bild M-P). Pfeile weisen exemplarisch auf NPY-positive Neurone. Skalabalken in P für Bild A-P = 50µm

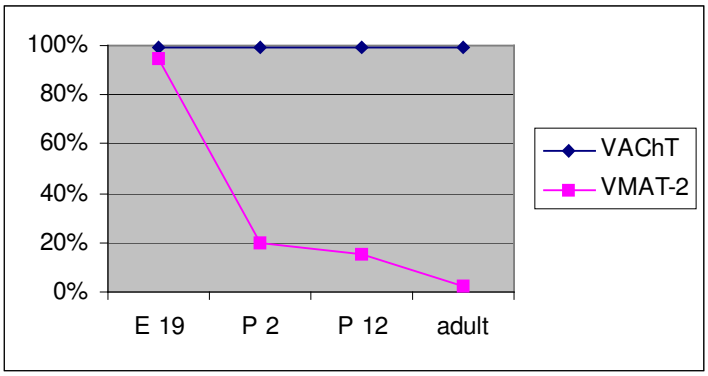

Abbildung 4.20: Verlauf der Expression von VAChT und VMAT-2 in den Neuronen des Ganglion submandibulare während der Entwicklung

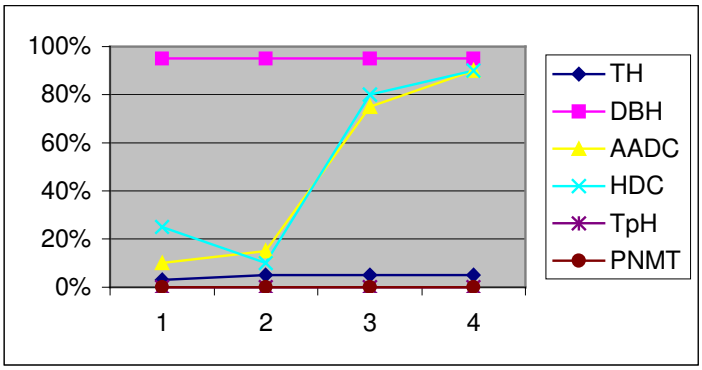

Abbildung 4.21: Verlauf der Expression von TH, DBH, AADC, HDC, TpH und PNMT in den Neuronen des Ganglion submandibulare während der Entwicklung

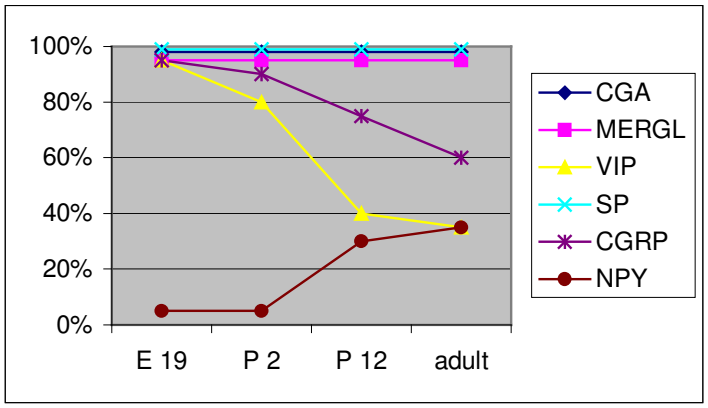

Abbildung 4.22: Verlauf der Expression von CgA, MERGL, VIP, SP, CGRP und NPY in den Neuronen des Ganglion submandibulare während der Entwicklung

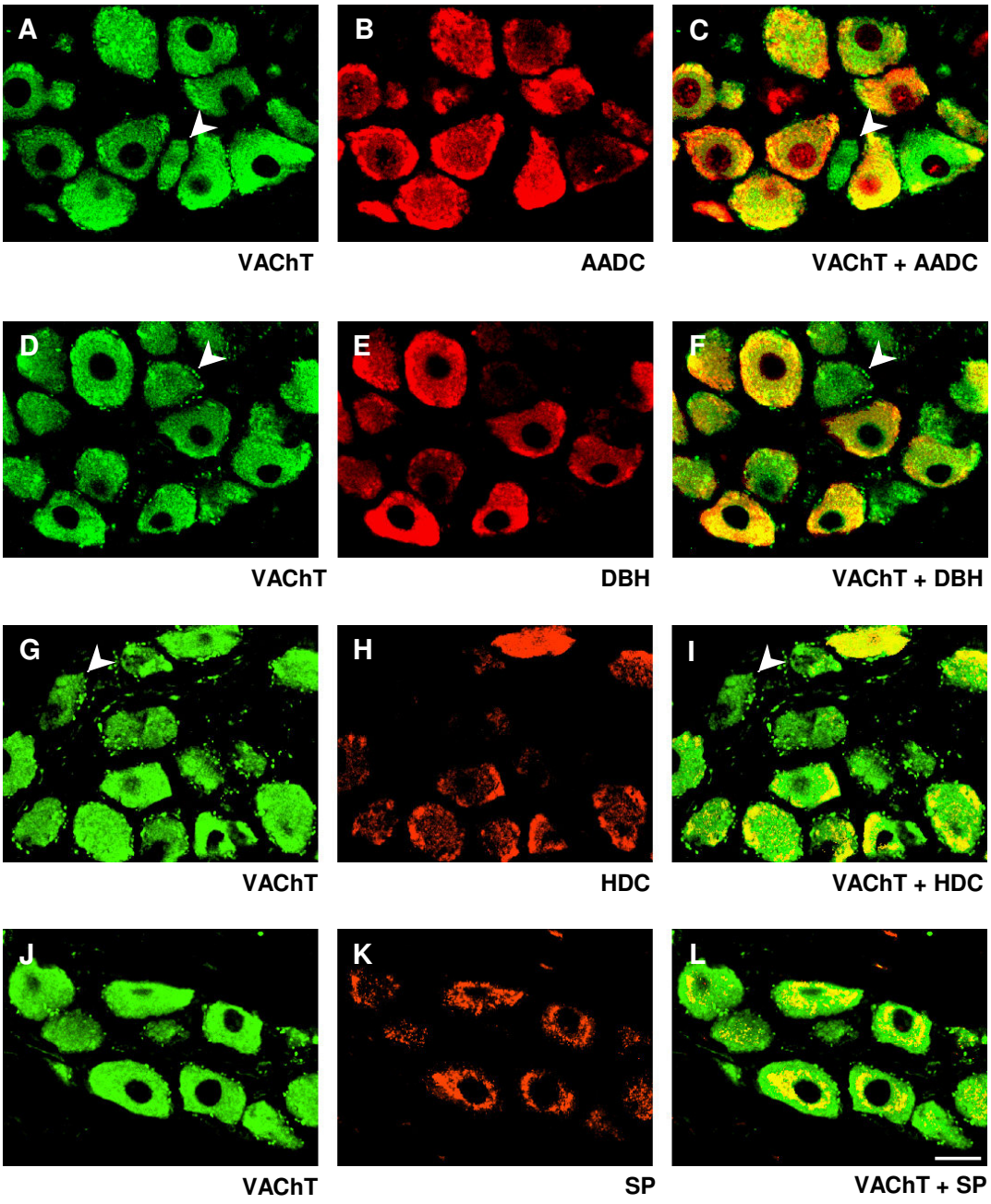

Abbildung 4.23: Fluoreszenz-Doppelmarkierung für VAChT gegen AADC, DBH, HDC und SP im adulten Ganglion submandibulare

Koexistenz von VAChT mit AADC (Bild A-C), DBH (Bild D-F), HDC (Bild G-I) und SP (Bild J-L) in verschiedenen Subpopulationen. Die Pfeilköpfe weisen jeweils exemplarisch auf nicht-kopositive Neurone. Zu beobachten war eine eher perimetrische Verteilung von AADC und HDC innerhalb der Neurone (Bild B und H) und eine eher perinukleäre Verteilung von SP (Bild K). Skalabalken in L für Bild A-L = 20µm

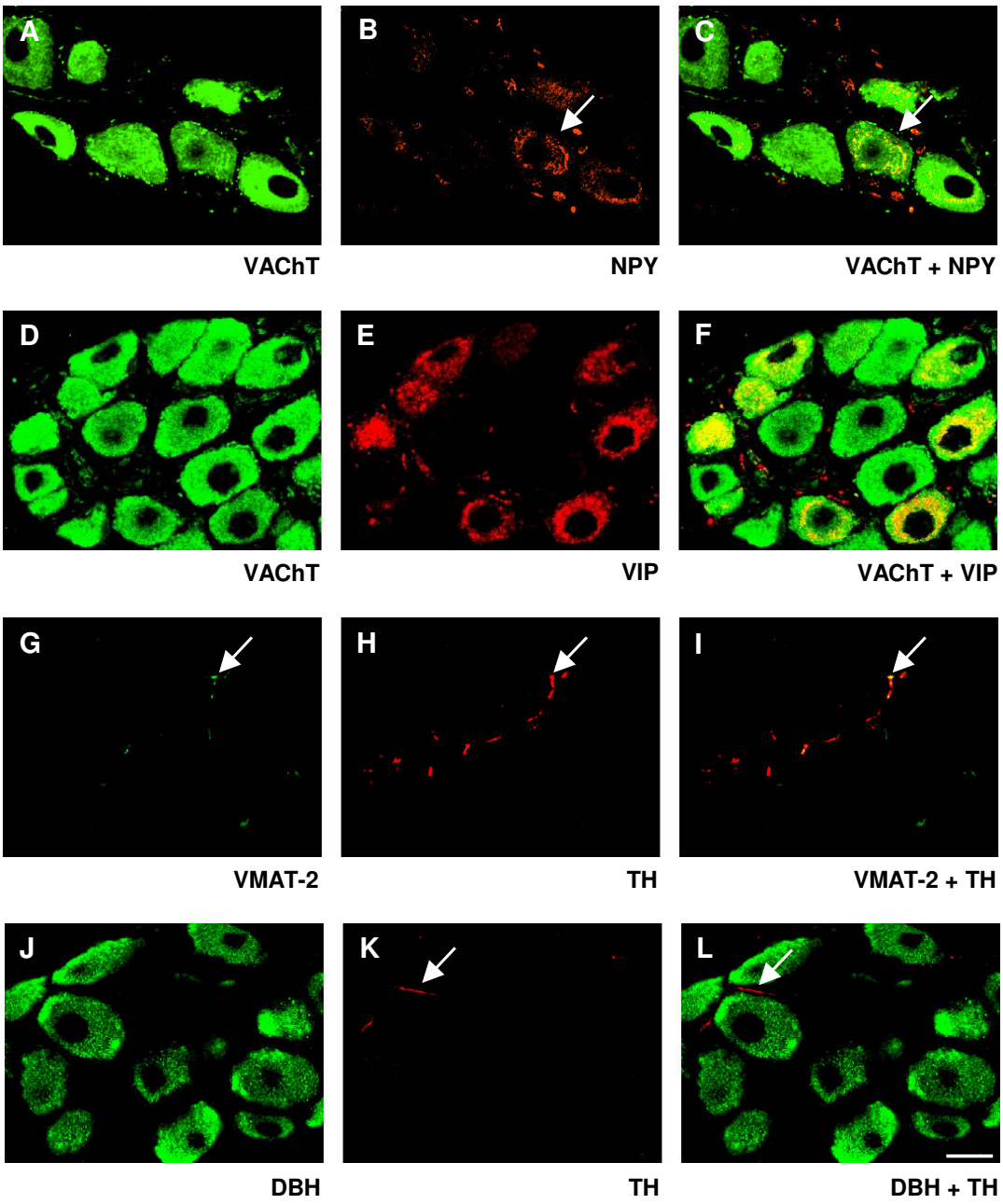

Abbildung 4.24: Fluoreszenz-Doppelmarkierung für VAChT gegen NPY und VIP, VMAT-2 gegen TH, sowie DBH gegen TH im adulten Ganglion submandibulare

Koexistenz von VAChT und NPY (Bild A-C) bei insgesamt schwacher NPY-Expression (Bild B). Koexistenz von VAChT und VIP nur in Subpopulationen (Bild D-F). Teilweise Koexistenz von VMAT-2 und TH in Fasern (Bild G-I), aber keine Koexistenz von DBH und TH in Fasern (Bild J-L). Skalabalken in L für Bild A-L = 20µm

4.4 Ganglion ciliare

4.4.1 Vesikuläre Transportproteine

VAChT: Die Expression von VAChT, dem obligaten vesikulären Transportprotein für Acetylcholin in cholinergen Neuronen, konnte in der Hauptpopulation der postganglionären Neurone des Ganglion ciliare (über 99%) permanent während der gesamten Entwicklung beobachtet werden (Abb. 4.25, A-D). Reaktionsnegative Neurone waren nur singulär zu beobachten (Abb. 4.25, C und D). In der Reaktionsstärke waren nur geringe Unterschiede zwischen den Neuronen zu sehen. Während der gesamten Entwicklung war eine grosse Anzahl VAChT-positiver prä- und postganglionäre Fasern im Ganglion ciliare zu beobachten.

VMAT-2: Die Expression von VMAT-2, dem vesikulären Transportprotein für Katecholamine, Serotonin und Histamin war zu keinem Zeitpunkt während der Entwicklung in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion ciliare zu beobachten (Abb. 4.25, E-H). Eine starke Zunahme der VMAT-2-Immunreaktivität während der Entwicklung hingegen war in Fasern festzustellen, die zahlreiche Kontakte mit den VMAT-2-negativen Neuronen des Ganglion ciliare eingingen (Abb. 4.25, G und H).

VGLUT: Anhaltspunkte für die Existenz eines glutamatergen Phänotyps in den postganglionären Neuronen des Ganglion ciliare, der mittels spezifischer Antikörper gegen die drei Isotypen des vesikulären Glutamtattransporters (VGLUT-1 bis -3) untersucht wurde, waren nicht gegeben. Zu keinem Zeitpunkt während der Entwicklung konnte Immunreaktivität gegen einen der drei Isotypen in den Neuronen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.4.2 Biogene Enzyme

TH: Erstaunlicherweise war die Expression von TH, dem ratenlimitierenden Enzym der Katecholaminsynthese, permanent und mit einem deutlichen Trend zur Zunahme während der Entwicklung in den postganglionären Neuronen des Ganglion ciliare zu beobachten (Abb. 4.25, I-L). Embryonal konnte bereits eine *S*ubpopulation von 25% TH-positiven Neuronen im Ganglion ciliare entdeckt werden. Bis zum adulten Stadium stieg die Anzahl der TH-positiven Neurone kontinuierlich bis auf 90% an. Zum Teil waren deutliche Unterschiede der TH-Reaktionsstärke zwischen den Neuronen zu erkennen. TH koexistierte im adulten Stadium in den meisten Neuronen mit VAChT (Abb. 4.31, J-L). In den Fasern innerhalb des Ganglions koexistierte TH teilweise mit VMAT-2 (Abb. 4.32, D-F). Es waren jedoch auch Fasern zu beobachten, die ausschliesslich TH-Immunreaktivität, bzw. ausschliesslich VMAT-2-Immunreaktivität aufwiesen. Die Anzahl TH-positiver Fasern im Ganglion ciliare nahm während der Entwicklung stark zu.

AADC: Zur Untersuchung eines möglichen katecholaminergen Phänotyps, der aufgrund des Nachweises der Expression von TH in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion ciliare zu vermuten war, wurde die Immunreaktivität für AADC in den Neuronen getestet. Die Expression von AADC, dem sowohl in der Dopaminsynthese, als auch in der Serotoninsynthese vorkommenden Enzym, war permanent in der überwiegenden Zahl der postganglionären Neurone des Ganglion ciliare zu beobachten (Abb. 4.26, A-D). Während der Entwicklung war ein leichter Rückgang der AADC-Expression zu sehen. Die Anzahl der AADC-positiven Neurone verringerte sich von 80% im embryonalen Stadium auf etwa 60% im adulten Stadium. Die Immunreaktivität für AADC in den verschiedenen Neuronen war unterschiedlich stark. Im adulten Stadium war AADC in einer Subpopulation der Neurone mit VAChT koexprimiert, was mittels Fluoreszenz-Doppelmarkierung in Abb. 4.31, A-C dargestellt ist. AADC koexistierte im adulten Stadium auch in einer Subpopulation der Neurone mit TH (Abb. 4.32, J-L). Es waren jedoch auch einzelne Neurone zu sehen, die lediglich AADC-Immunreaktivität, jedoch keine TH-Immunreaktivität aufwiesen.

In den späten postnatalen Entwicklungsstadien war eine grössere Anzahl AADC-positiver Fasern zu sehen. Im adulten Stadium war teilweise eine Koexistenz von AADC und VMAT-2 in den Fasern an den postganglionären Neuronen des Ganglion ciliare zu beobachten (Abb. 4.32, G-I).

DBH: Die Expression von DBH, dem Enzym, das für die Synthese von Noradrenalin notwendig ist, war permanent in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion ciliare zu sehen, nahm während der Entwicklung jedoch deutlich ab (Abb. 4.25, M-P). Embryonal waren über 90% der Neurone DBH-positiv, im adulten Stadium nur noch 35%. Die Reaktionsstärke von DBH zeigte teilweise beträchtliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Neuronen. Im adulten Stadium koexistierte DBH in einer Subpopulation der Neurone mit VAChT (Abb. 4.31, D-F). Die Anzahl der DBH-positiven Fasern im Ganglion ciliare nahm während der Entwicklung leicht zu.

PNMT: Das Enzym für die Synthese von Noradrenalin zu Adrenalin, PNMT, war zu keinem Zeitpunkt während der Entwicklung in den postganglionären Neuronen des Ganglion ciliare zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Die Existenz eines adrenergen Phänotyps konnte daher so gut wie ausgeschlossen werden.

TpH: Um einen serotoninergen Phänotyp in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion ciliare zu untersuchen, dessen Existenz aufgrund der Expression von AADC in den Neuronen zu vermuten war, wurde die Immunreaktivität für TpH getestet. Die Expression von TpH war jedoch zu keinem Zeitpunkt während der Entwicklung in den postganglionären Neuronen des Ganlion ciliare zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Auch die Expression des Serotonin-Membrantransporters (SERT) und von Serotonin (5-HT) war nicht nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Damit konnte die Existenz eines serotoninergen Phänotyps so gut wie ausgeschlossen werden.

HDC: Überraschenderweise war das in histaminergen Neuronen vorkommende Enzym HDC permanent während der Entwicklung in den postganglionären Neuronen des Ganglion ciliare exprimiert (Abb. 4.26, E-H). Die Anzahl der

HDC-positiven Neurone blieb während der gesamten Entwicklung mit leichten Schwankungen relativ konstant bei etwa 60%. Die Reaktionsstärke der verschiedenen Neurone wies teilweise grosse Unterschiede auf. HDC war in einer Subpopulation der Neurone mit VAChT koexistent (Abb. 4.31, G-I). HDC-positive Fasern innerhalb des Ganglion ciliare waren vor allem in den späten Entwicklungsstadien und in grosser Anzahl zu sehen (Abb. 4.26, G und H).

4.4.3 Neuropeptide und Chromogranin A

VIP: Der zur Sekretin/Glukagon-Familie gehörende cholinerge Kotransmitter VIP war während der Entwicklung erstaunlicherweise nur in etwa 50% bis 60% der postganglionären Neurone des Ganglion ciliare exprimiert (Abb. 4.27, A-D). Die Stärke der Immunreaktivität für VIP war in den verschiedenen Neuronen unterschiedlich stark. Vor allem in den späten Entwicklungsstadien waren im Ganglion ciliare zahlreiche prä- und postganglionäre VIP-positive Fasern zu sehen (Abb. 4.27, C und D).

NPY: Die Expression des noradrenergen Kotransmitters NPY zeigte während der Entwicklung eine Zunahme in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion ciliare (Abb. 4.27, M-P). Embryonal waren nur etwa 10% der Neurone NPY-positiv. Bis zum adulten Stadium vergrösserte sich die Anzahl der NPY-positiven Neurone auf 40%. Die Reaktionsstärke in den Neuronen nahm während der Entwicklung insgesamt stark zu. Im adulten Stadium koexistierte NPY in einer Subpopulation der Neurone mit VAChT (Abb. 4.32, A-C). Innerhalb der Neurone waren die Immunreaktionen für NPY eher perinukleär verteilt zu sehen (Abb. 4.32, B). Im Ganglion ciliare waren während der Entwicklung zahlreiche NPY-positive Fasern zu beobachten.

CGRP: Das hauptsächlich in sensorischen Neuronen vorkommende Neuropeptid CGRP war während der Entwicklung permanent in einer grossen Population der postganglionären Neurone des Ganglion ciliare exprimiert (Abb. 4.27, I-L). Die Anzahl der CGRP-positiven Neurone schwankte über den Zeitraum vom embryonalen bis zum adulten Stadium zwischen 80% und 90%. Die Stärke der Immunreaktion in den Neuronen nahm während der Entwicklung

deutlich zu. Dennoch waren auch im adulten Stadium neben stark CGRP-positiven Neuronen schwach CGRP-positive Neurone zu sehen (Abb. 4.27, L). CGRP-positive Fasern waren in mässiger Anzahl im Ganglion ciliare zu sehen.

MERGL: Die Expression des Opioidpepeptids MERGL nahm während der Entwicklung in den postganglionären Neuronen des Ganglion ciliare deutlich zu (Abb. 4.26, M-P). Embryonal waren 35% der Neurone MERGL-positiv. Bis zum adulten Stadium stieg die Anzahl der MERGL-positiven Neurone auf 85% an. Es zeigten sich teilweise beträchtliche Unterschiede in der Reaktionsstärke zwischen den verschiedenen Neuronen. Vor allem im adulten Stadium waren zahlreiche MERGL-positive Fasern im Ganglion ciliare zu beobachten (Abb. 4.26, P).

SP: Die Expression des Präprotachykinins SP in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion ciliare verringerte sich während der Entwicklung deutlich (Abb. 4.27, E-H). Embryonal exprimierten etwa 35% der Neurone SP (Abb. 4.27, E). Postnatal ging die Anzahl der SP-exprimierenden Neurone sukzessive zurück. Im adulten Stadium waren keine SP-positiven Neurone mehr im Ganglion ciliare zu sehen (Abb. 4.27, H). Lediglich präganglionäre Terminalen an den Neuronen des Ganglion ciliare waren im adulten Stadium noch zu beobachten.

CgA: Zur Untersuchung der vesikulären Ausstattung der postganglionären Neurone des Ganglion ciliare wurde die Immunreaktivität für CgA, einem obligaten Vesikulogen getestet. Es zeigte sich eine permanente CgA-Expression in etwa 98% der Neurone während der Entwicklung (Abb. 4.26, I-L). Die Stärke der Immunreaktionen in den Neuronen nahm vom embryonalen bis zum adulten Stadium stark ab und zeigte teilweise beträchtliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Neuronen.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.28 – 4.30 graphisch dargestellt und in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

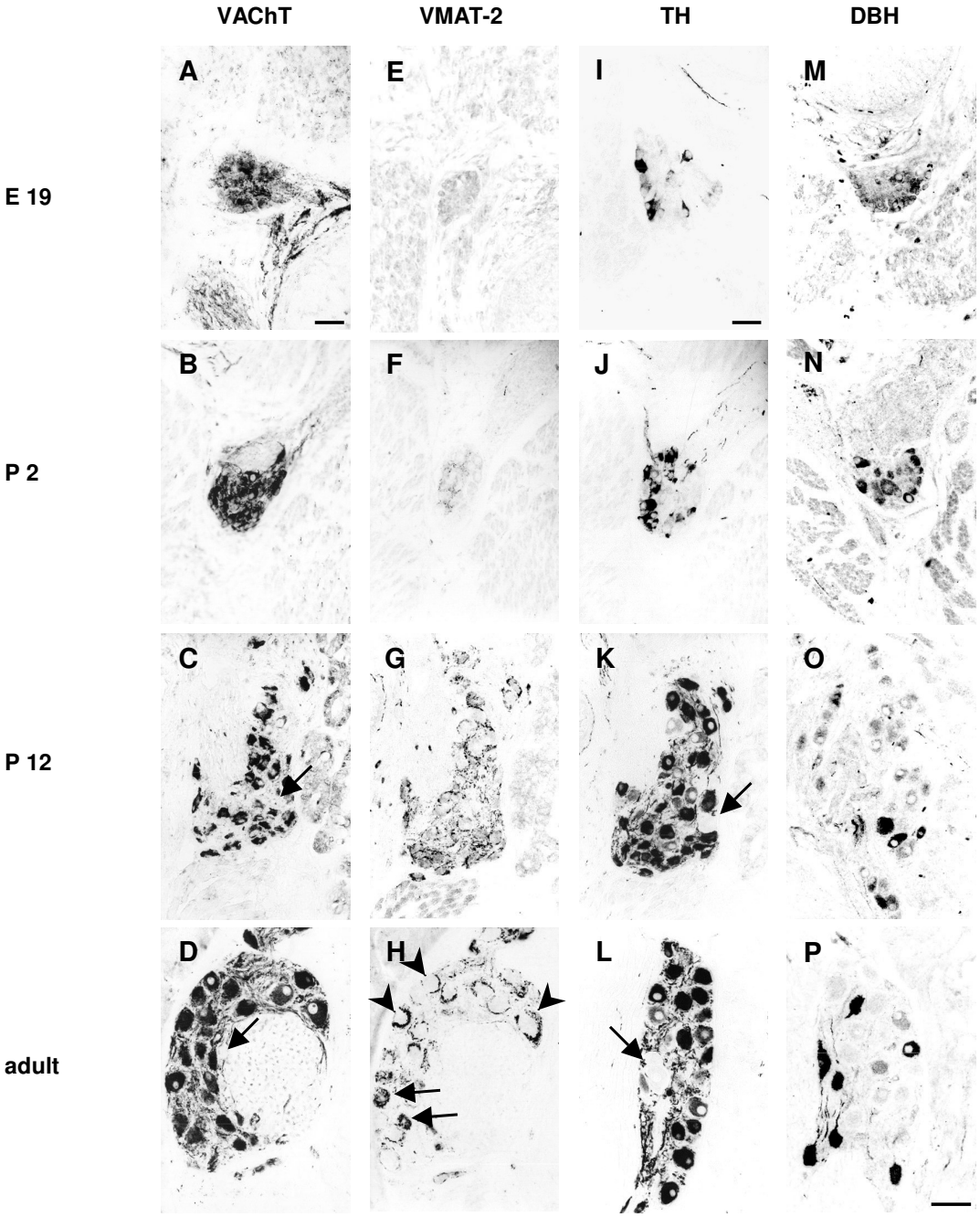

Abbildung 4.25: DAB/Nickel-Immunhistochemie für VAChT, VMAT-2, TH und DBH im Ganglion ciliare über die Entwicklung

Konstant hohe Expression von VAChT (Bild A-D) mit singulär auftretenden reaktionsnegativen Neuronen (Pfeile in C und D). Keine VMAT-2-positiven Neurone während der Entwicklung (Bild E-H), aber stark VMAT-2-positive Fasern in späten Stadien (Pfeilköpfe in H); Pfeile in H weisen auf Neurone, die anschnittsbedingt durch Überlagerung mit VMAT-2-positiven Fasern VMAT-2-positiv erscheinen, aber negativ sind. Deutliche Zunahme der TH-positiven Neurone (Bild I-L); Pfeile in K und L weisen exemplarisch auf TH-negative Neurone. Abnahme der DBH-positiven Neurone (Bild M-P). Skalabalken in P für Bild B-H und J-P = 25µm; Skalabalken in A und I = 12,5µm

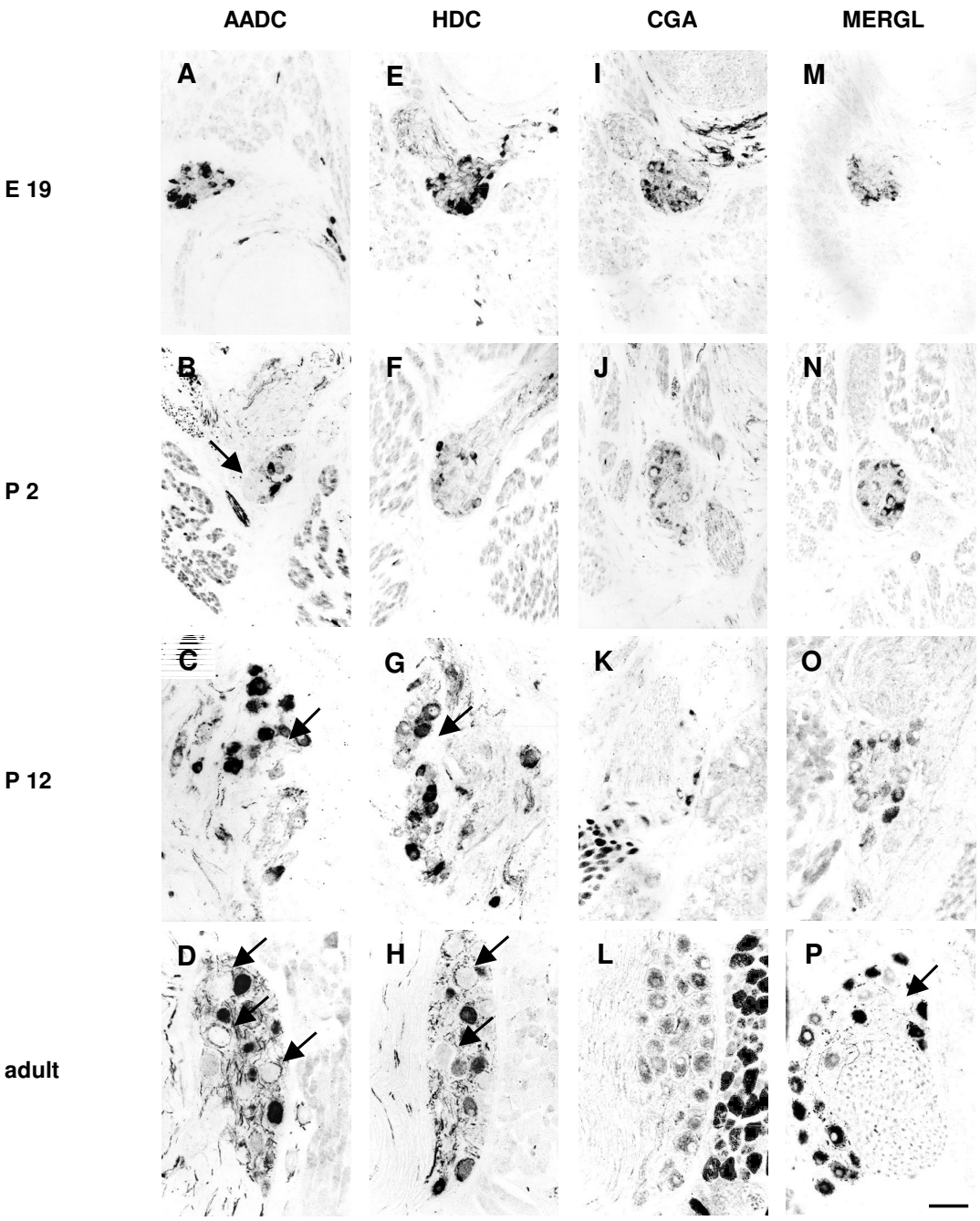

Abbildung 4.26: DAB/Nickel-Immunhistochemie für AADC, HDC, CgA und MERGL im Ganglion ciliare über die Entwicklung

Leichte Abnahme der Expression von AADC in den Neuronen (Bild A-D); Pfeile weisen auf AADC-negative Neurone. Leicht schwankendes Expressionsmuster von HDC (Bild E-H); Pfeile in G und H weisen auf HDC-negative Neurone. Konstant hohe Expression von CgA unterschiedlicher Reaktionsstärke (Bild I-L). Zunahme der Expression von MERGL (Bild M-P) mit einzelnen reaktionsnegativen Neuronen (Pfeil in P). Skalabalken in P für Bild A-P = 25 µm

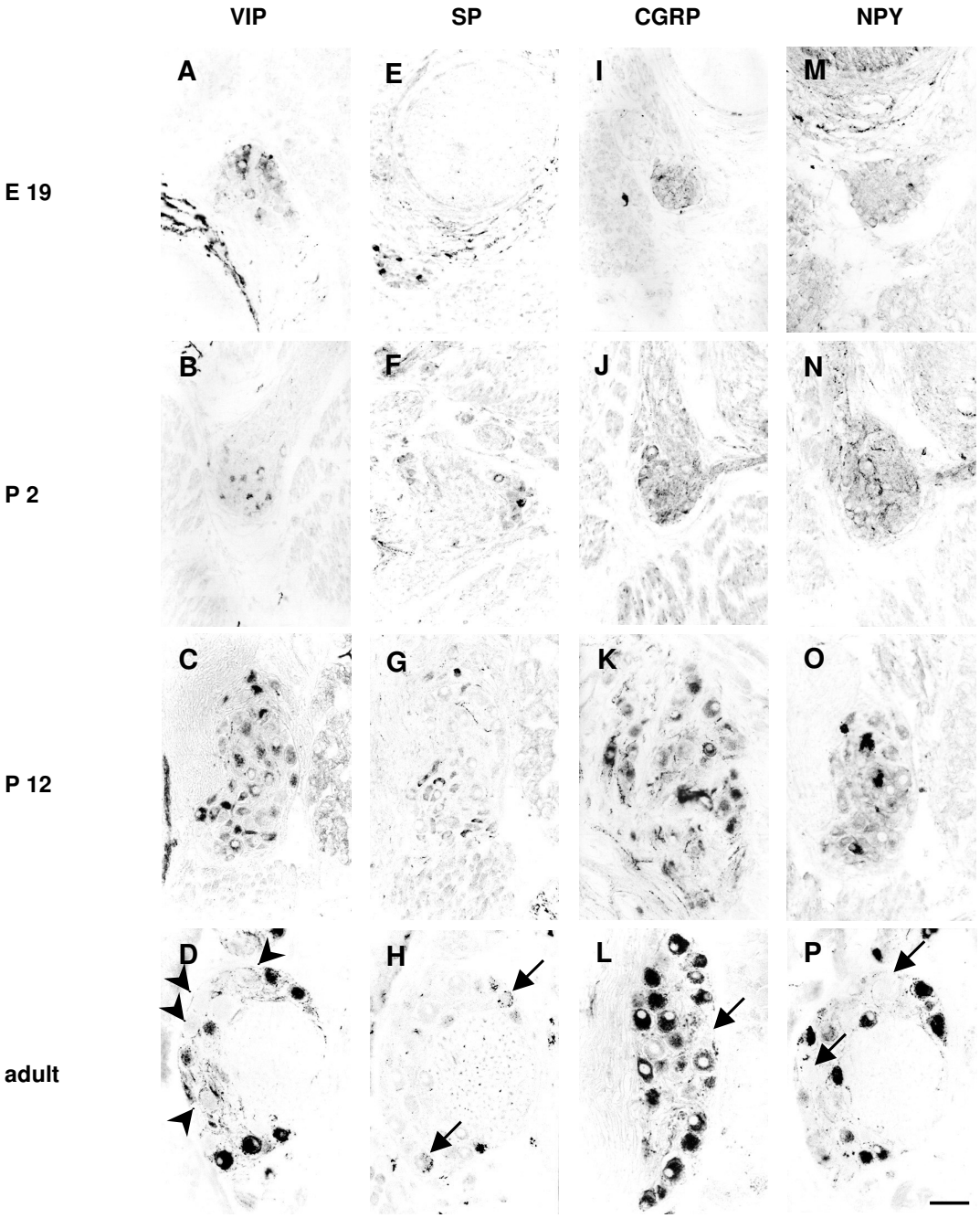

Abbildung 4.27: DAB/Nickel-Immunhistochemie für VIP, SP, CGRP und NPY im Ganglion ciliare über die Entwicklung

Leichter Anstieg der VIP-Expression (Bild A-D) mit zahlreichen VIP-negativen Neuronen (exemplarisch Pfeilköpfe in D). Abnahme der Expression von SP (Bild E-H). Pfeile weisen auf SP-positive Fasern an den Neuronen. Relativ konstante Expression von CGRP mit deutlicher Zunahme der Reaktionsstärke während der Entwicklung (Bild I-L); Pfeil weist exemplarisch auf CGRP-negatives Neuron. Zunahme der NPY-positiven Neurone mit deutlicher Zunahme der Reaktionsstärke (Bild M-P), Pfeile in P weisen auf NPY-negative Neurone. Skalabalken in P für Bild A-P = 25µm

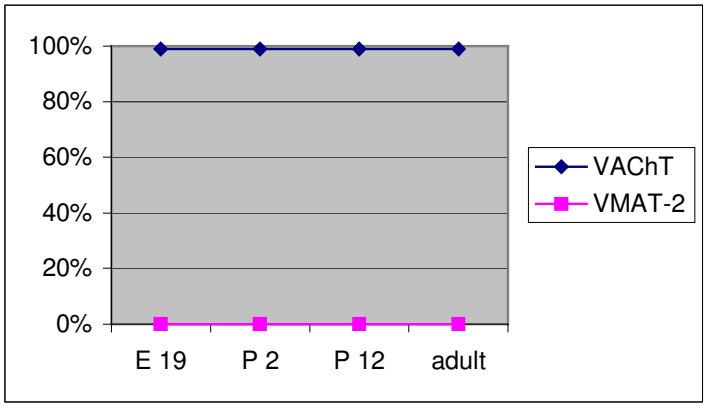

Abbildung 4.28: Verlauf der Expression von VAChT und VMAT-2 in den Neuronen des Ganglion ciliare während der Entwicklung

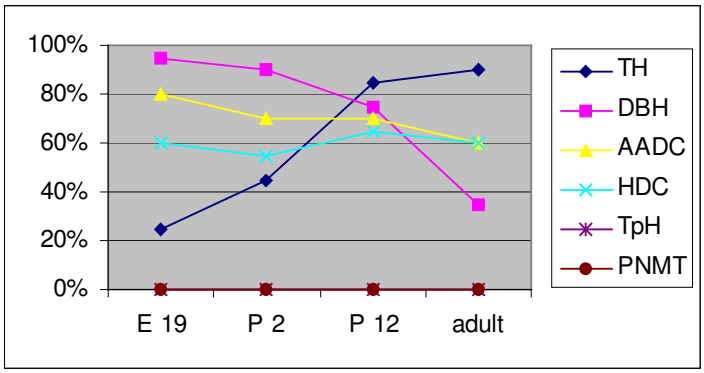

Abbildung 4.29: Verlauf der Expression von TH, DBH, AADC, HDC, TpH und PNMT in den Neuronen des Ganglion ciliare während der Entwicklung

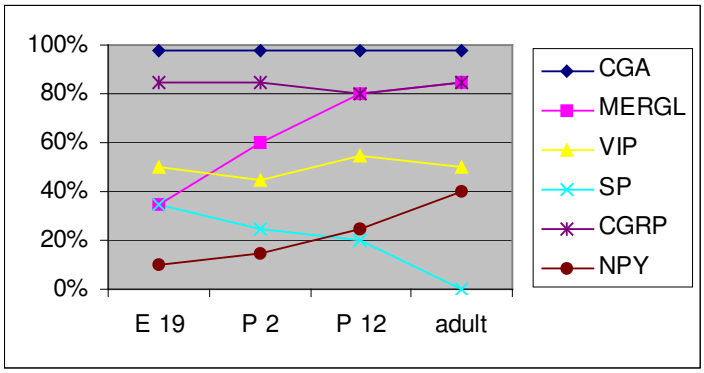

Abbildung 4.30: Verlauf der Expression von CgA, MERGL, VIP, SP, CGRP und NPY in den Neuronen des Ganglion ciliare während der Entwicklung

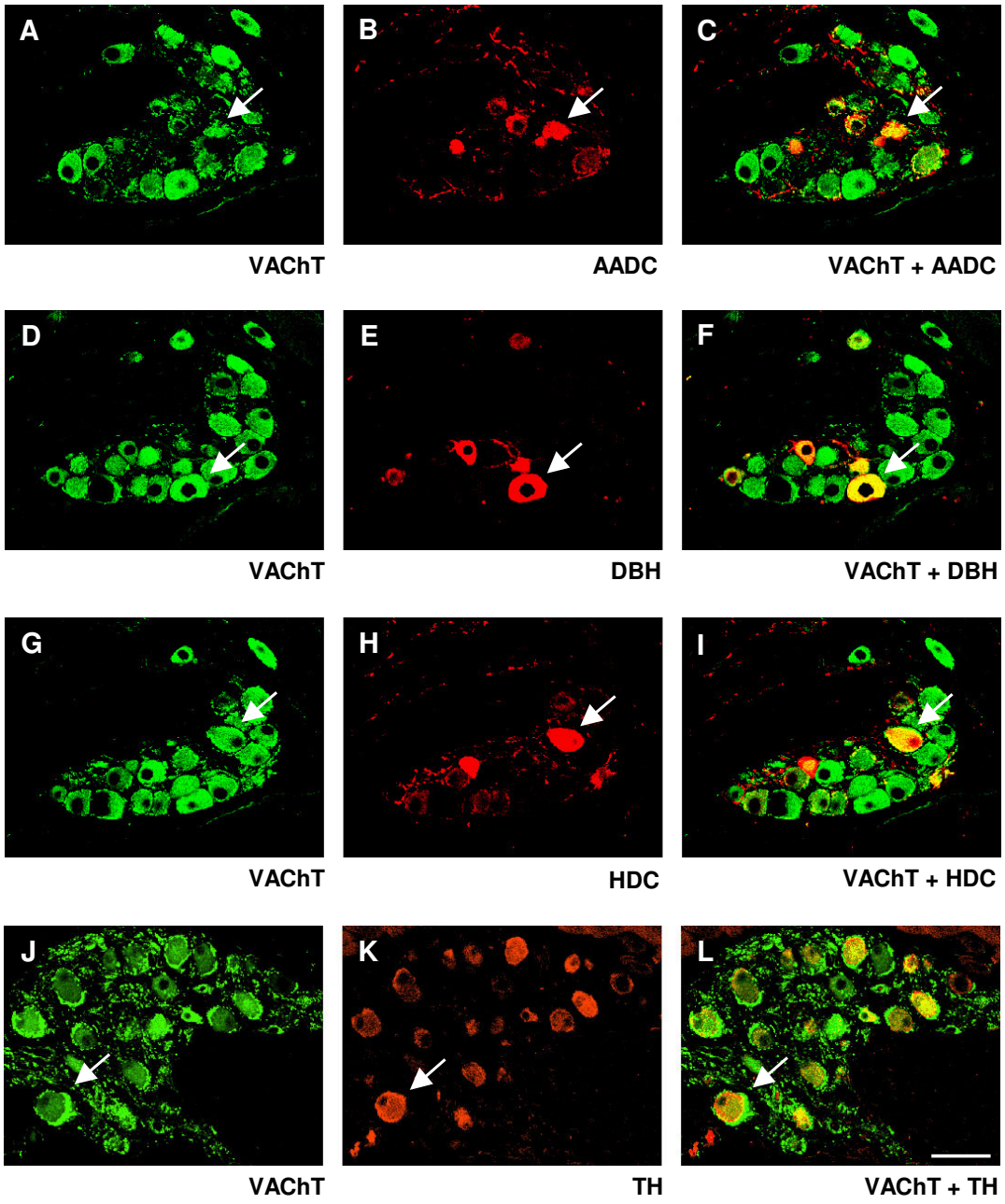

Abbildung 4.31: Fluoreszenz-Doppelmarkierung für VAChT gegen AADC, DBH, HDC und CGRP im adulten Ganglion ciliare

Koexistenz von VAChT mit AADC (Bild A-C), DBH (Bild D-F), HDC (G-I) und TH (Bild J-L) in Subpopulationen der Neurone. Die Pfeile weisen exemplarisch jeweils auf kopositive Neurone. Teilweise waren stark VAChT-positive präganglionäre Terminalen zu sehen (Pfeilspitzen in A und J). Skalabalken in L für Bild A-L = 50 µm

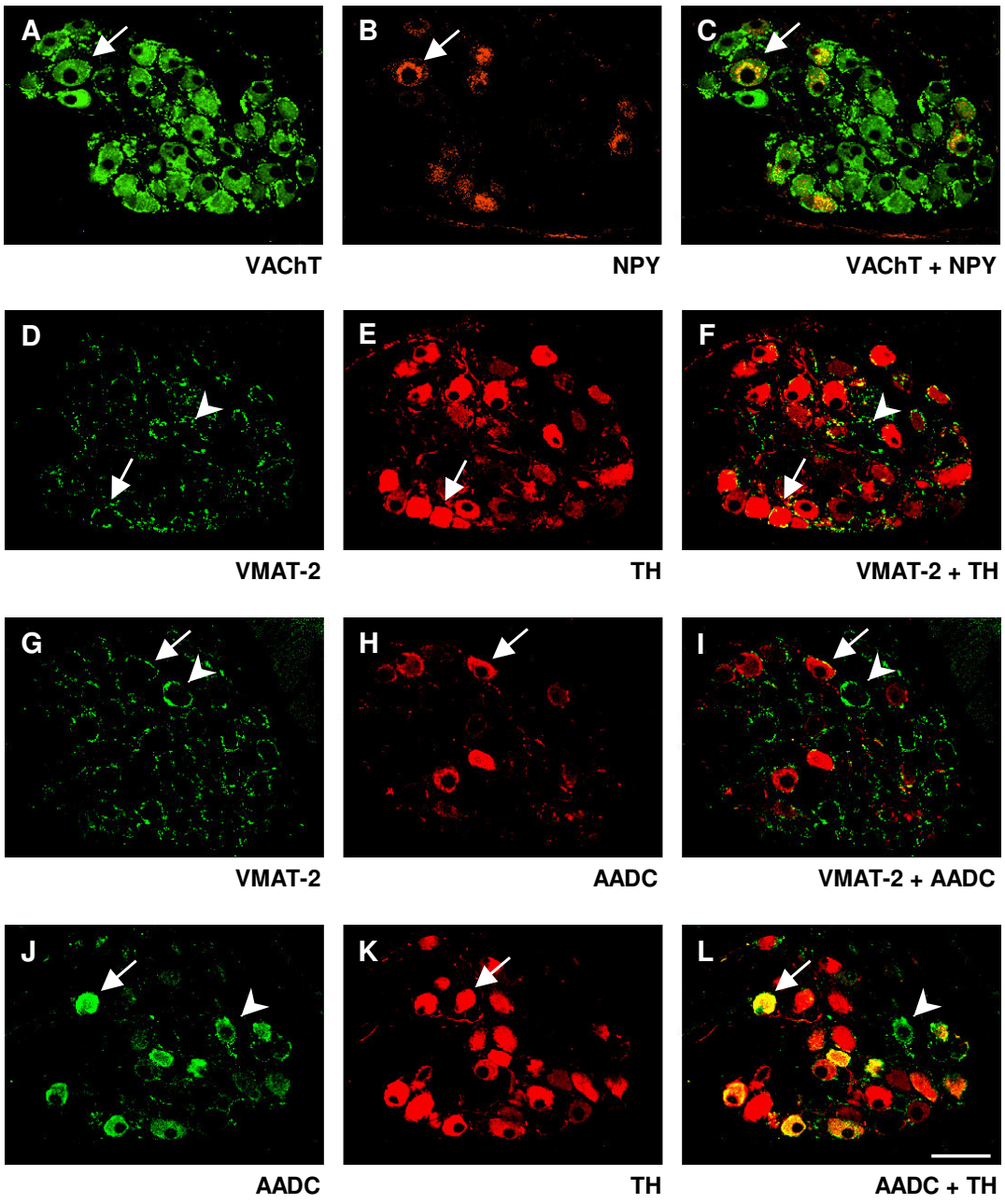

Abbildung 4.32: Fluoreszenz-Doppelmarkierung für VAChT gegen NPY, VMAT-2 gegen TH und AADC, sowie AADC gegen TH im adulten Ganglion ciliare

Koexistenz von VAChT und NPY in vereinzelten Neuronen, mit Pfeilen gekennzeichnet (Bild A-C). VMAT-2-Immunreaktivität war lediglich in Fasern zu sehen (Bild D und G), die Kontakt sowohl mit TH- und AADC-positiven, als auch mit TH- und AADC-negativen Neuronen hatten (Bild F, bzw. I). Teilweise koexistierte VMAT-2 mit TH, bzw. AADC in den Fasern. Koexistenz (Pfeile), bzw. Non-Koexistenz (Pfeillöpfe) von AADC und TH in einer Subpopulation der Neurone (Bild J-L). Insgesamt fiel die eher perimetrische Verteilung der AADC-Reaktionen innerhalb der Neurone auf. Skalabalken in L für Bild A-L = 50 µm

4.4.4 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse

	Ganglion oticum				Ganglion sphenopalatinum				Ganglion submandibulare				Ganglion ciliare			
	E 19	P 2	P 12	adult	E 19	P 2	P 12	adult	E 19	P 2	P 12	adult	E 19	P 2	P 12	adult
VAChT	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%
VMAT-1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
VMAT-2	95%	70%	40%	1%	90%	45%	10%	1%	95%	20%	10%	2%	0%	0%	0%	0%
VGLUT 1-3	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
TH	5%	10%	5%	5%	5%	8%	4%	5%	3%	5%	5%	5%	25%	45%	85%	90%
AADC	35%	40%	45%	85%	60%	60%	65%	75%	10%	15%	75%	90%	80%	70%	70%	60%
DBH	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	95%	90%	75%	35%
PNMT	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
TpH	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
HDC	45%	15%	75%	90%	35%	10%	40%	60%	25%	10%	80%	90%	60%	55%	65%	60%
VIP	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	95%	80%	40%	35%	50%	45%	55%	50%
NPY	45%	45%	60%	85%	15%	20%	25%	50%	5%	5%	30%	35%	10%	15%	25%	40%
CGRP	95%	85%	85%	85%	90%	85%	45%	40%	95%	90%	75%	60%	85%	85%	80%	85%
MERGL	60%	60%	70%	85%	10%	20%	35%	40%	95%	95%	95%	95%	35%	60%	80%	85%
SP	95%	90%	90%	95%	80%	75%	30%	20%	99%	99%	99%	99%	35%	25%	20%	0%
CgA	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%	98%

Tabelle 4.1: Zusammenfassende Übersicht der prozentualen Anteile der reaktionspositiven postganglionären Neurone in den vier kranialen parasympathischen Ganglien während der Ontogenese

Abkürzungen: *VAChT* = vesikulärer Acetylcholintransporter, *VMAT* = vesikulärer Monoamintransproter, *VGLUT* = vesikulärer Glutamattransporter, *TH* = Tyrosin-Hydroxylase, *AADC* = L-aromatische Aminosäure-Decarboxylase, *DBH* = Dopamin-ß-Hydroxylase, *PNMT* = Phenylethanolamin-*N*-Methyltransferase, *TpH* = Tryptophan-Hydroxylase, *HDC* = Histidin-Decarboxylase, *VIP* = Vasoaktives Intestinales Polypeptid, *NPY* = Neuropeptid Y, *CGRP* = Calcitonin-gene related peptide, *MERGL* = Met^{5}-Enkephalin-Arg^{6}-Gly^{7}-Leu^{8}, *SP* = Substanz P, *CgA* = Chromogranin A

4.5 Small Intensely Fluorescent Cells (SIF Zellen)

Im adulten Ganglion sphenopalatinum wurden zahlreiche SIF Zellen gefunden, die meistens in Zellhaufen (sog. „cluster“) zusammengelagert waren, aber zum Teil auch singulär auftraten. Sie unterschieden sich von den postganglionären Neuronen des Ganglions durch ihre geringere Grösse im Vergleich zu den postganglionären Neuronen und das Fehlen von VIP- und VAChT-Immunreaktivität (Daten nicht gezeigt). Die starke TH-Immunreaktivität diente zur Identifizierung der SIF Zellen.

Mittels Fluoreszenz-Doppelmarkierung ist die Koexistenz von VMAT-2 mit TH und AADC dargestellt. Es zeigten sich einige TH- und AADC-positive Zellen, die keine VMAT-2-Immunreaktivität aufwiesen (Abb. 4.23, A-C, bzw. D-F). VMAT-1 war in so gut wie allen TH-positiven SIF Zellen koexistent, jedoch zeigte sich in den meisten Zellen nur schwache VMAT-1-Immunreaktivität (Abb. 4.24, A-C). Eine vollständige Überlappung der Immunreaktivität fand sich für AADC mit TH, bzw. DBH mit TH (Abb. 4.24, D-F, bzw. G-I).

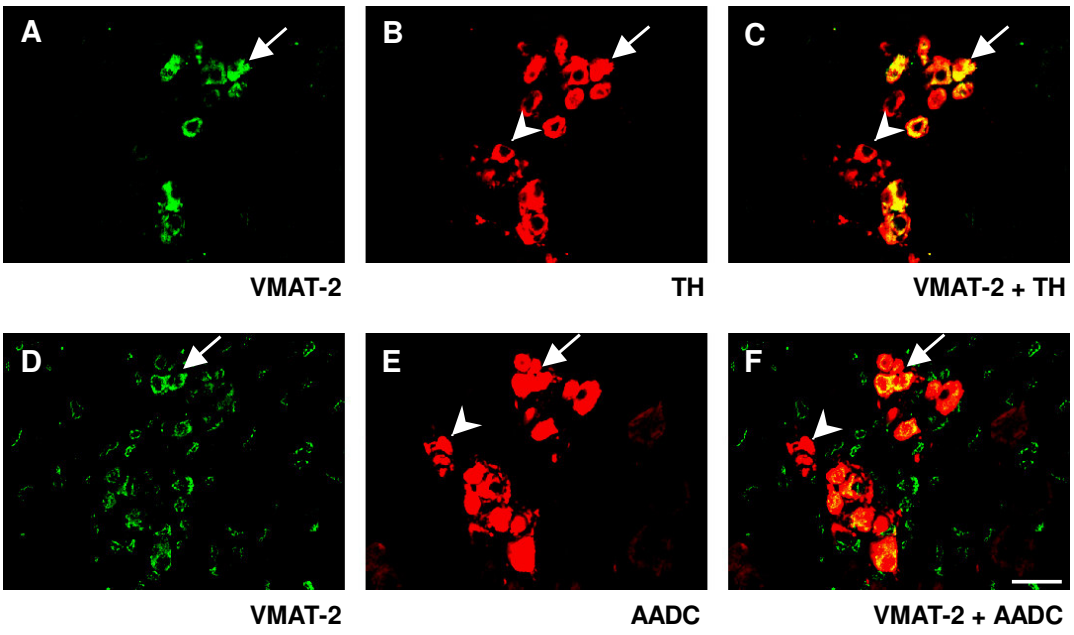

Abbildung 4.23: Fluoreszenz-Doppelmarkierung für VMAT-2 gegen TH und AADC in SIF Zellen im adulten Ganglion sphenopalatinum

Koexistenz von VMAT-2 und TH in den meisten SIF Zellen (Bild A-C). Geringe Koexistenz von VMAT-2 und AADC (Bild D-F). Pfeile kennzeichnen kopositive Zellen, Pfeilköpfe kennzeichnen TH-positive Zellen. Skalabalken in F für Bild A-F = 20 µm

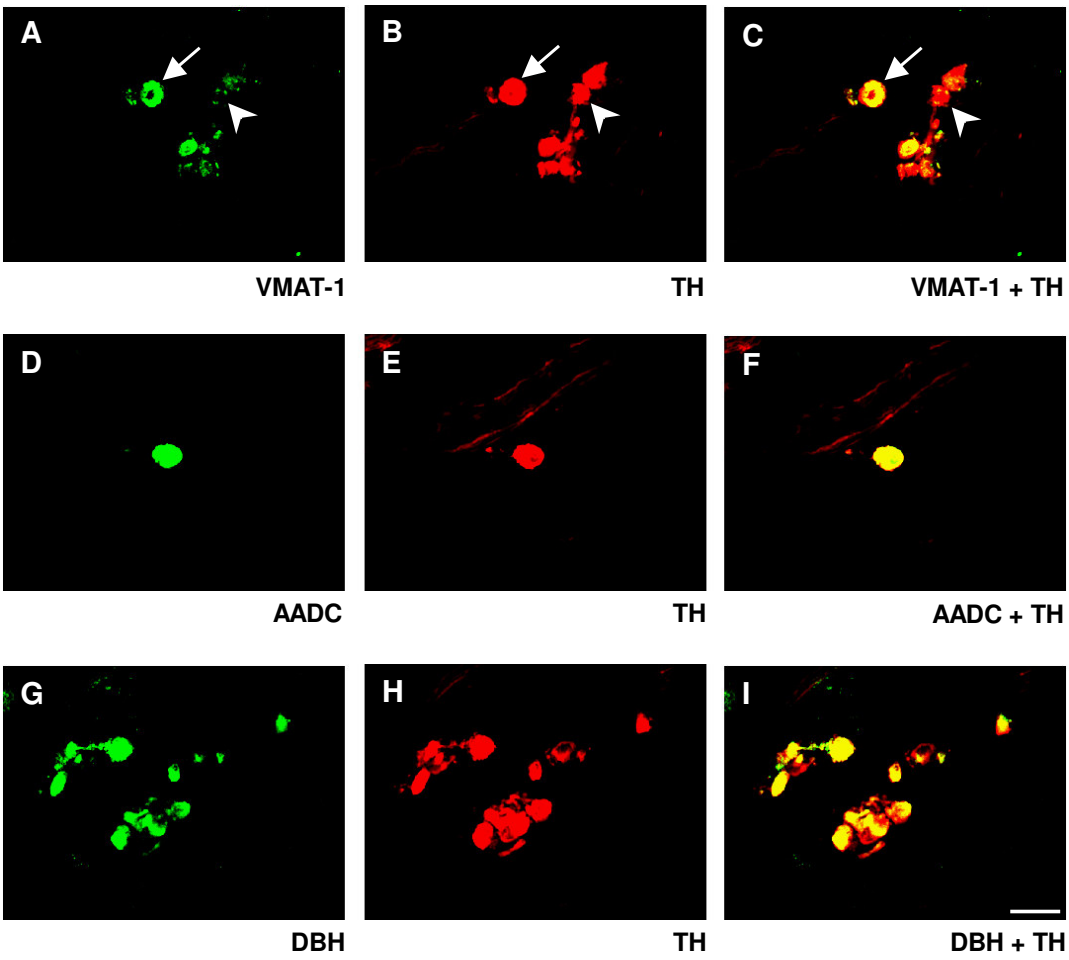

Abbildung 4.24: Fluoreszenz-Doppelmarkierung für VMAT-1, AADC und DBH gegen TH in SIF Zellen im adulten Ganglion sphenopalatinum

Koexistenz von VMAT-1 und TH (Bild A-C). Pfeile weisen exemplarisch auf kopositive Zelle. Meist jedoch schwache VMAT-1-Immunreaktionen in den Zellen (Pfeilköpfe). Koexistenz von AADC, bzw. DBH und TH mit vollständiger Überlappung der Expression in den Zellen (Bild D-F, bzw. G-I). Skalabalken in I für Bild A-I = 20µm

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit liefert erstmalig eine umfassende Analyse über den chemischen Phänotyp der postganglionären Neurone der vier kranialen parasympathischen Ganglien der Ratte während der Ontogenese. Insbesondere wurde die differentielle Ausstattung der postganglionären parasympathischen Neurone mit vesikulären Transportproteinen für Acetylcholin, Monoamine und Glutamat, sowie Enzymen für die Synthese von Katecholaminen, Serotonin und Histamin erfasst. Zudem wurden neue peptiderge Phänotypen in Relation zum cholinergen und aminergen Phänotyp charakterisiert. Ausserdem wurde zum ersten Mal der chemische Phänotyp der SIF Zellen im Ganglion sphenopalatinum genauer charakterisiert, als bisher beschrieben.

5.1 Bedeutung der differentiellen Expression des Vesikulären Acetylcholintransporters und des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids

Der cholinerge Phänotyp der postganglionären Neurone des Ganglion oticum, sphenopalatinum, submandibulare und ciliare wurde durch den Nachweis der Expression des vesikulären Transportproteins für Acetylcholin, VAChT, in so gut wie allen Neuronen während der gesamten Entwicklung eindeutig identifiziert. Diese Beobachtungen stimmen grösstenteils mit früheren Studien überein, die hauptsächlich an adulten Ratten durchgeführt wurden [68, 74, 76, 112, 122, 128, 129, 138, 176, 180, 206] und liefern darüberhinaus eine Analyse der VAChT-Expression in den Neuronen der kranialen parasympathischen Ganglien während der prä- und postnatalen Entwicklung bis hin zum adulten Stadium. In

gelegentlichen Einzelfällen wurden VAChT-negative Neurone gefunden, über die von anderen Autoren bisher noch nicht berichtet wurde.

Gemäss dem etablierten Konzept, dass das Neuropeptid Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) ein Kotransmitter in cholinergen Neuronen ist [101], wurde in der Regel VIP in den meisten cholinergen VAChT-positiven Neuronen des Ganglion oticum und des Ganglion sphenopalatinum gefunden. In seltenen Einzelfällen wurden jedoch VAChT-positive Neurone beobachtet, die kein VIP enthielten.

Im Kontrast zu diesen beiden Ganglien nahm die VIP-Expression in den postganglionären Neuronen des Ganglion submandibulare während der Entwicklung deutlich ab. Dass die Anzahl VIPerger Neurone im adulten Ganglion submandibulare variabel sein kann, wurde in der Literatur bereits beschrieben [144, 196]. Die Ursache und funktionelle Bedeutung der hier erstmals entdeckten Abnahme der Population VIPerger Neurone im Ganglion submandibulare im Verlauf der Entwicklung zum adulten Stadium hin bleibt unklar. Eine mögliche Erklärung für die Abnahme von VIP in den Neuronen des Ganglion submandibulare während der postnatalen Entwicklung bis hin zum Erwachsenenstadium könnte auf eine zunehmende Spezialisierung der Neurone auf bestimmte Zielstrukturen innerhalb der Submandibulardrüse, wie z.B. die Gefässe und/oder den mukösen Drüsenanteil hindeuten. Die fehlende Abnahme der VIP-Expression in den Neuronen des Ganglion oticum und sphenopalatinum, nicht aber des Ganglion submandibulare, könnte einerseits mit der Innervation rein seröser Drüsen, andererseits oder zusätzlich mit der Innervation der Zerebralarterien durch diese Neurone in Zusammenhang stehen.

Im Ganglion ciliare hingegen war VIP während der gesamten Entwicklungszeit nur in etwa der Hälfte der Neurone exprimiert. Die Angaben in der Literatur zur VIP-Expression in den Neuronen des adulten Ganglion ciliare der Ratte schwanken beträchtlich. So waren von einigen Autoren nur wenige VIP-positive Neurone [76], von anderen hingegen weit über 90% VIP-positive Neurone im adulten Ganglion ciliare beschrieben worden [206]. Die Expression von VIP zu früheren Entwicklungsstadien in den Neuronen des Ganglion ciliare war bislang noch nicht untersucht worden. Es stellt sich die Frage nach den Zielgebieten der VIP-positiven Neurone im Ganglion ciliare. Wahrscheinlich innervieren die

VIPergen postganglionären Neurone des Ganglion ciliare hauptsächlich die Gefässe der Iris, des Ciliarkörpers und der Konjunktiva. In der Literatur sind VIP-positive Nervenfasern in der Iris und im Ciliarkörper der Ratte beschrieben [201, 216].

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Frage nach einem möglichen glutamatergen Phänotyp in den Neuronen der kranialen parasympathischen Ganglien der Ratte angegangen. Während der gesamten prä- und postnatalen Entwicklung bis zum adulten Stadium war keiner der drei Isotypen des vesikulären Transportproteins für Glutamat, VGLUT-1 –3, die verlässliche Marker für glutamaterge Neurone darstellen [179, 229], in den postganglionären Neuronen der kranialen parasympathischen Ganglien exprimiert. Ein glutamaterger Phänotyp konnte somit in diesen Neuronen so gut wie ausgeschlossen werden. Lediglich vereinzelte VGLUT-2-positive Fasern waren u.a. im adulten Ganglion oticum zu sehen, die höchstwahrscheinlich von trigeminalen Neuronen stammen und funktionell zur sensorisch-parasympathischen Kopplung beitragen.

5.2 Bedeutung der Expression des vesikulären Monoamintransporters

In der vorliegenden Arbeit wurde der vesikuläre Monoamintransporter VMAT-2, der sowohl Katecholamine (Dopamin, Noradrenalin, bzw. Adrenalin) als auch Serotonin oder Histamin in die Vesikel transportiert, während der Embryonalzeit in der Hauptpopulation der Neurone des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare exprimiert gefunden. Während der postnatalen Ontogenese nimmt nach dem Befund der vorliegenden Arbeit die Zahl der VMAT-2-exprimierenden Neurone drastisch ab. Damit wurden erste Evidenzen für eine Abnahme der Expression von VMAT-2 in den postganglionären Neuronen des Ganglion oticum während der Entwicklung, wie in früheren Studien [180] erhoben, bestätigt und darüber hinausgehend erstmals quantifiziert. VMAT-2 wurde zusätzlich in den gelegentlich vorkommenden Mastzellen in den kranialen parasympathischen Ganglien gefunden (Daten nicht gezeigt). Der vesikuläre Monoamintransporter VMAT-1 war zu keinem Zeitpunkt während der prä- und

postnatalen Entwicklung in den postganglionären Neuronen der kranialen parasympathischen Ganglien exprimiert.

Unbelassen der Frage, ob und welche biogenen Amine oder deren Vorstufen in den postganglionären Neuronen des Ganglion oticum, sphenopalatinum, bzw. submandibulare synthetisiert und/oder von extrazellulär her aufgenommen werden, bedeutet die Reduktion der VMAT-2-Expression zum adulten Stadium hin den Verlust der Fähigkeit dieser Neurone, eine vesikelgesteuerte Monoaminfreisetzung zu gewährleisten. Ob in den späten Entwicklungsstadien bis zum adulten Stadium eine nicht vesikelgesteuerte Freisetzung von Monoaminen stattfindet, wie sie unter anderem für GABA [16] und Acetylcholin [93] beschrieben wurde, bleibt dahingestellt. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Expression von VMAT-2 bis in das adulte Stadium bestehen bleibt, der Spiegel der Expression jedoch zu niedrig ist, um detektiert werden zu können. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass Chromogranin A, das obligat für die Bildung von „dense-core-Vesikeln“ ist [104], in den postganglionären Neuronen der kranialen parasympathischen Ganglien während der gesamten prä- und postnatalen Entwicklung exprimiert ist.

Ein weiterer Aspekt hinsichtlich der VMAT-2-Expression betrifft die Regulierung der Entwicklung der Neurone. Die Neurone der parasympathischen Kopfganglien entwickeln sich bekanntermassen aus Zellen in der Kopfregion der Neuralleiste [30, 70]. Die Neurone sympathischer Ganglien entwickeln sich aus Zellen in der Rumpfregion der Neuralleiste [114]. Durch die enge Nachbarschaft beider Regionen könnte sich eine partielle Vermischung sympathischer neuronaler Phänotypen in den parasympathischen Kopfganglien entwickeln, wobei Faktoren wie BMP-2 und BMP-6 möglicherweise eine Rolle spielen [27, 240]. Auch ein cranio-caudaler Gradient von TGF-ß könnte einen Einfluss auf die Entstehung eines gemischten sympathisch-parasympathischen Phänotyps haben. Die sukzessive Abnahme der VMAT-2-Expression in den Neuronen des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare während der postnatalen Entwicklung könnte auf den Verlust eines solchen Gradienten zurückzuführen sein.

Das Ganglion ciliare bildet insofern eine Ausnahme, als in seinen postganglionären Neuronen zu keinem Zeitpunkt während der Entwicklung die Expression von VMAT-2 zu sehen war. Das Fehlen von VMAT-2 in den

Neuronen des Ganglion ciliare ist ein Erstbefund. Im Gegensatz zu den drei oben genannten Ganglien ist die hohe Dichte VMAT-2-positiver Endigungen an den Neuronen auffällig. Dies deutet auf die Existenz einer sympathisch-parasympathischen Kopplung auf Niveau des Ganglion ciliare hin.

5.3 Bedeutung der differentiellen Expression der Enzyme für biogene Amine

Die Expression des ratenlimitierenden Enzyms für die Katecholaminbiosynthese, Tyrosinhydroxylase (TH), konnte während der gesamten Entwicklung nur in einer kleinen Subpopulation der postganglionären Neurone des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen decken sich insofern mit denen einiger Autoren, als eine geringe TH-Expression im adulten Stadium in den Neuronen des Ganglion oticum [112], des Ganglion sphenopalatinum [112, 114] und des Ganglion submandibulare [144, 186, 195, 196] der Ratte beschrieben wurde. Andere Autoren verneinten hingegen die Anwesenheit von TH-positiven Neuronen sowohl im Ganglion oticum [76], als auch im Ganglion sphenopalatinum [76, 138]. Sämtliche bisherige Untersuchungen wurden jedoch, im Gegensatz zur vorliegenden Studie, ausschliesslich an den Ganglien im adulten Stadium durchgeführt.

Die in dieser Arbeit gezeigte rudimentäre Ausstattung mit TH während der gesamten Entwicklungszeit bedeutet, dass den Neuronen der drei genannten Ganglien auch während der Phase der transienten VMAT-2-Expression die Fähigkeit zur Katecholaminbiosynthese auf klassischem Weg fehlt. Damit stellt sich die Frage nach dem Substrat für VMAT-2 während der Phase der VMAT-2-Expression. Einerseits kann es sich dabei um Histamin handeln, andererseits um Katecholamine, die auf alternativen Stoffwechselwegen synthetisiert werden (s.u.).

In den postganglionären Neuronen des Ganglion oticum und sphenopalatinum war in den frühen postnatalen Stadien ein vorübergehender Anstieg der TH-Expression zu beobachten. Von Glukokortikoiden ist bekannt, dass sie die TH-Synthese in sympathischen Neuronen stimulieren [209]. Auch der Plasmaspiegel

zirkulierender Glukokortikoide zeigt eine transiente Erhöhung kurz nach der Geburt [118]. Dies könnte der Grund für den vorübergehenden Anstieg der TH-Expression in den Neuronen dieser Ganglien während dieser Phase sein.

In den postganglionären Neuronen des Ganglion submandibulare blieb die TH-Expression während der Entwicklung nahezu konstant niedrig.

Angesichts des sporadischen Auftretens der TH-positiven Neurone in den Ganglien konnte der Phänotyp dieser Neurone nicht hinreichend aufgeschlüsselt werden und bleibt somit unklar.

Auch im Fall der TH-Expression bildet das Ganglion ciliare eine Ausnahme. Die Expression von TH in den postganglionären Neuronen des Ganglion ciliare stieg während der Entwicklung deutlich an. In der Literatur waren von mehreren Autoren im adulten Ganglion ciliare der Ratte TH-positive Neurone beschrieben worden [76, 111, 219, 227]. Eine Katecholamin-Fluoreszenz wurde in den Neuronen jedoch nicht detektiert [112].

Der Grund für die Steigerung der TH-Expression in den Neuronen des Ganglion ciliare könnte in der Freisetzung eines, oder mehrerer neurotropher Faktoren, wie z.B. NGF, aus einem, oder mehreren Innervationsgebieten sein. Von NGF ist bekannt, dass es die TH-Synthese in sympathischen Neuronen stimuliert [86]. Es wurde gezeigt, dass die Neurone des Ganglion ciliare der Ratte NGF-Rezeptoren besitzen [132] und auf Stimulation durch NGF mit erhöhtem Neuritenwachstum reagieren [26]. Somit wäre denkbar, dass aus den Innervationsgebieten des Ganglion ciliare NGF freigesetzt wird und so die TH-Synthese in den Neuronen angeregt wird.

Die Expression von AADC und DBH in den postganglionären Neuronen des Ganglion ciliare nahm während der prä- und postnatalen Entwicklung stetig ab, blieb aber in mehr als der Hälfte der Neurone im adulten Stadium bestehen. In der Literatur waren bisher weder Angaben über die Expression von AADC, noch über die Expression von DBH in den Neuronen des Ganglion ciliare der Ratte zu finden.

Im Gegensatz zur Abnahme der AADC- und DBH-Expression in den Neuronen des Ganglion ciliare nahm, wie weiter oben bereits beschrieben, die Expression von TH während der prä- und postnatalen Entwicklung bis zum adulten Stadium zu. Damit war die Annahme eines reinen noradrenergen Phänotyps eher unwahrscheinlich. Hier könnte es sich möglicherweise um einen gemischten

Phänotyp handeln, bei dem Noradrenalin und sogenannte „trace amines“ (Spurenamine), wie z.B. Octopamin (s.u.) parallel produziert werden. Es liegt somit ein weiteres Beispiel für einen cholinergen Phänotyp mit einem kryptischen noradrenergen Phänotyp vor, wie er von anderen Autoren bereits beschrieben wurde [238].

Einerseits findet in den Neuronen des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare während der prä- und postnatalen Entwicklung eine transiente VMAT-2-Expression bei gleichzeitiger rudimentärer Expression von TH statt; andererseits nimmt die TH-Expression in den Neuronen des Ganglion ciliare während der prä- und postnatalen Entwicklung kontinuierlich zu, wobei die Expression von VMAT-2 gänzlich fehlt. Diese Tatsachen deuten darauf hin, dass die Expression von VMAT-2 und TH in den Neuronen der kranialen parasympathischen Ganglien unabhängig voneinander reguliert sein muss.

Interessanterweise nahm die AADC-Expression in den postganglionären Neuronen des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare während der prä- und postnatalen Entwicklung bis zum adulten Stadium teils beträchtlich zu. Gleichzeitig fehlte die Expression von TH in diesen Neuronen und die VMAT-2-Expression nahm während dieser Zeit drastisch ab. Für die Expression von AADC in den Neuronen des Ganglion oticum und des Ganglion submandibulare der Ratte war in der Literatur kein Hinweis zu finden. In den Neuronen des Ganglion sphenopalatinum der Ratte wurde die Existenz von AADC bisher nur vermutet [114]. Der Nachweis auf Proteinebene war bislang ausgeblieben.
Angesichts des Fehlens der TH-Expression in den meisten AADC-produzierenden Neuronen des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare stellt sich die Frage nach der Funktion von AADC in diesen Neuronen. Zum einen könnte die AADC-Expression in den Neuronen ein bedeutungsloses embryologisches Relikt sein, das über die Entwicklung beständig geblieben ist. Zum anderen könnte AADC in den Neuronen durch die Aufnahme von L-DOPA von extrazellulär her bezüglich der weiteren Prozessierung von L-DOPA eine Bedeutung gewinnen. Tatsächlich gibt es experimentelle Hinweise für einen Aufnahmemechanismus für L-DOPA, wie

auch für Dopamin in parasympathischen Neuronen. Dies wurde bisher allerdings nur im Ganglion ciliare der Ratte dargestellt [43]. Ein möglicher zellulärer Aufnahmemechanismus für L-DOPA könnte auch in den Neuronen der anderen parasympathischen Ganglien existieren und somit die weitere Prozessierung von L-DOPA durch AADC und DBH zu Noradrenalin gewährleisten.

Eine weitere Möglichkeit der Katecholaminsynthese bei gleichzeitigem Fehlen von TH könnte das Enzym Tyrosinase bieten, das normalerweise in der Melaninsynthese vorkommt und Tyrosin zu L-DOPA umwandelt [174]. Aus der Literatur ist bekannt, dass Tyrosinase in Abwesenheit von Tyrosin-Hydroxylase ebenfalls Katecholamin synthetisierende Eigenschaften besitzt [8]. Die Tyrosinase könnte in den Neuronen des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare als alternatives Enzym für die Umwandlung von Tyrosin zu L-DOPA sorgen. In TH-Null Mäusen wurde dieser alternative Stoffwechselweg u.a. in sympathischen Ganglien postuliert [164].

Die Fähigkeit zur Synthese von Adrenalin konnte aufgrund fehlender PNMT-Expression in den postganglionären Neuronen aller vier kranialer parasympathischer Ganglien während der gesamten Entwicklungszeit so gut wie ausgeschlossen werden.

Ein serotoninerger Phänotyp, der aufgrund der AADC-Expression ebenfalls anzunehmen war, konnte in allen vier untersuchten Ganglien so gut wie ausgeschlossen werden. Die Tryptophan-Hydroxylase (TpH), 5-Hydroxytryptophan (5-HT/Serotonin) und der Serotonin-Membrantransporter (SERT) waren zu keinem Zeitpunkt während der Entwicklung in den Neuronen der kranialen parasympathischen Ganglien exprimiert.

Die Dynamik der AADC-Expression in den Neuronen des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare während der prä- und postnatalen Ontogenese steht im Gegensatz zur permanenten DBH-Expression in der Hauptpopulation der Neurone dieser Ganglien. DBH wurde schon in früheren Studien in den postganglionären Neuronen des adulten Ganglion oticum und Ganglion sphenopalatinum nachgewiesen, jedoch nur in einer sehr kleinen Subpopulation [76]. Ebenso war die Expression von DBH in den Neuronen des adulten Ganglion submandibulare in der Literatur beschrieben worden [28, 69].

Die Koexistenz der Enzyme AADC und DBH in den Neuronen des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare im adulten Stadium lässt die Existenz eines kryptischen noradrenergen Phänotyps vermuten. Voraussetzung dafür ist jedoch entweder die Umwandlung von Tyrosin zu L-DOPA durch das Enzym Tyrosinase, oder die Aufnahme von L-DOPA, bzw. Dopamin von extrazellulär. Dies würde einen nicht-klassischen noradrenergen Phänotyp bedeuten, bei dem das vesikuläre Transportprotein VMAT-2 eventuell fehlt. Möglicherweise wird in den frühen Entwicklungsstadien vorwiegend Dopamin zur weiteren Verstoffwechselung zu Noradrenalin durch DBH von den Neuronen aufgenommen (s.o.). Während der Entwicklung könnte dann eine Umstellung des Aufnahmemechanismus hin zu der Aufnahme von L-DOPA stattfinden, das intrazellulär durch das hochregulierte AADC zu Dopamin und weiter durch DBH zu Noradrenalin verstoffwechselt wird. Wohlgemerkt würde dieser Mechanismus unabhängig von der Existenz von TH ablaufen, was die bisherige Lehrbuchmeinung, die TH als das ratenlimitierende Enzym der Katecholaminbiosynthese bezeichnet, relativiert.

Über die klassische Funktion von DBH hinaus ist DBH in den Stoffwechselweg sogenannter „trace-amines“ (Spurenamine), wie Octopamin und ß-Phenylethanolamin eingebunden [28]. Octopamin wird durch Betahydroxylierung von DBH aus Tyramin synthetisiert [169] und wurde in frühen Studien vor allem in Invertebraten erforscht. In Säugern wurde Octopamin als Kotransmitter von Noradrenalin beschrieben [10] und ist unter anderem ein Ligand an ß(3)-Adrenozeptoren [57]. Funktionell wurde Octopamin eine Beteiligung an der Lipolyse, dem Glukosetransport in die Fettzellen [57], dem Aktivitätszustand des Gehirns [31] und, zusammen mit Tyramin, der Relaxation der Aorta [228] zugeschrieben. Auch ein Zusammenhang zwischen Octopamin und der alkoholischen Enzephalopathie aufgrund der Überproduktion dieses „falschen“ Transmitters mit konsekutiver Besetzung der Bindungsstellen ist in der Literatur beschrieben worden [66].

Octopamin kann als alternatives Stoffwechselprodukt von DBH angesehen werden. Octopamin könnte aus Tyramin synthetisiert werden, falls es direkt in die postganglionären Neurone der kranialen parasympathischen Ganglien

aufgenommen wird. Es ist nicht bekannt ob und wenn wie Octopamin aus den Neuronen freigesetzt wird.

Die Tatsache, dass die AADC-Expression während der Entwicklung in den Neuronen zunimmt, könnte eine mögliche Umstellung von einer Aufnahme von Tyramin zu einer Aufnahme von Phenylalanin in die Neurone bedeuten, das weiter durch AADC zu p-Tyramin verstoffwechselt wird.

Eine mögliche Produktion von Octopamin in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion oticum und des Ganglion sphenopalatinum könnte für die Innervation der Zerebralarterien eine wichtige Bedeutung haben. Da Octopamin als kompetitiver Ligand mit Noradrenalin an Adrenorezeptoren fungiert, jedoch nur ein Fünfzigstel bis ein Hundertstel der Wirkung von Noradrenalin besitzt, könnte man spekulieren, dass durch Ausschüttung von Octopamin aus den Terminalen der postganglionären Neurone des Ganglion oticum und sphenopalatinum an den Zerebralarterien und Bindung an die Adrenorezeptoren der Gefässe die Bindungsstellen für Noradrenalin besetzt werden. Durch die zu geringe Wirkung von Octopamin auf die Gefässe würde eine Relaxierung der Gefässe mit konsekutiver Steigerung des zerebralen Blutflusses erreicht werden. Dies könnte die Möglichkeit der experimentellen Blockade von Octopamin-Rezeptoren eröffnen, um so in die Regulierung der zerebralen Durchblutung einzugreifen. Klinisch bedeutsam wären solche Versuche hinsichtlich der Entstehung z.B. des Spannungskopfschmerzes und der Migräne.

In der Glandula submandibularis der Ratte wurde eine octopaminabhängige Steigerung des Speichelflusses und der Proteinsekretion aufgrund der Affinität von Octopamin zu alpha- und beta-Adrenorezeptoren beschrieben [148, 149]. Auch dieser Mechanismus könnte auf der Verdrängung der „klassischen“ Liganden Adrenalin und Noradrenalin an diesen Rezeptoren basieren. Aufgrund der gleichen Ausstattung der Neurone des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare mit DBH könnte dieser Mechanismus auch in der Glandula parotis (Ganglion oticum), den Glandulae sublinguales (Ganglion submandibulare) und der Glandula lacrimalis (Ganglion sphenopalatinum) ablaufen. Dies würde neue pharmakologische Ansatzpunkte in der Therapie von Krankheiten mit gestörtem Tränen- und Speichelfluss, wie dem Sicca-Syndrom, oder der Hypersalivation bei Morbus Parkinson ermöglichen.

Die Funktion von Octopamin in den Neuronen des Ganglion ciliare könnte sich auf die Regulierung der Blutgefässe z.B. des Ciliarkörpers erstrecken. Die Diskrepanz zwischen der zunehmenden Expression von TH und der abnehmenden Expression von AADC und DBH legt jedoch die Hypothese der Produktion eines weiteren Stoffwechselproduktes von Tyrosin, bzw. Phenylalanin nahe. Um diesen Sachverhalt endgültig zu klären, sind noch weitere Exprerimente notwendig.

Der Grund für die Expression noradrenerger Eigenschaften in den Neuronen der kranialen parasympathischen Ganglien liegt möglicherweise in der Entwicklungsgeschichte. Der Transkriptionsfaktor Mash1 wird in allen autonomen Vorläuferzellen exprimiert [5] und soll essentiell für die Entwicklung aller zentraler und peripherer Neurone sein, die permanent oder transient noradrenerge Eigenschaften exprimieren [87]. Bei Abwesenheit von Mash1 kommt es zu keiner DBH-Expression in sympathischen Neuronen [87]. Ebenso sind die Transkriptionsfaktoren Phox2a und Phox2b an der Entwicklung und Regulierung noradrenerger Phänotypen in den Neuronen von Vertebraten beteiligt [139, 153]. Phox2a ist ein positiver Regulator des DBH-Gens und u.a. essentiell für die Entwicklung parasympathischer Ganglien [87, 136]. In einer experimentellen Studie wurde gezeigt, dass sowohl Mash1, als auch Phox2a und Phox2b in den Neuronen des Ganglion ciliare beim Huhn exprimiert sind [139]. Falls dies auch für die parasympathischen Neurone von Säugetieren gilt und Mash1, Phox2a und Phox2b in den postganglionären Neuronen der kranialen parasympathischen Ganglien der Ratte während der Entwicklung exprimiert sind, könnte darin der Grund für die Expression von Komponenten des noradrenergen Syntheseapparates in diesen Ganglien liegen.

Die Erklärung für das uneinheitliche Expressionsmuster von Enzymen, die klassischerweise in die Synthese von Monoaminen eingebunden sind, kann unter der Voraussetzung der oben diskutierten Aufnahme von Vorstufen der Katecholaminsynthese einerseits in der Synthese von Katecholaminen liegen, andererseits können die exprimierten Enzyme auch in alternative Stoffwechselwege, wie z.B. die Synthese von Spurenaminen eingebunden sein. Diese Stoffwechselprodukte können durch VMAT-2, das im adulten Stadium eventuell nur noch auf einem sehr geringen Niveau vorhanden ist, bzw. durch

ein noch nicht bekanntes vesikuläres Transportprotein in die Vesikel verpackt und exozytiert, oder auf nicht vesikulärem Weg freigesetzt werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass diese Stoffwechselprodukte eine noch unbekannte intrakrine Funktion in diesen Neuronen besitzen.

Der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis der Expression von HDC in den postganglionären Neuronen des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare und deren Zunahme während der prä- und postnatalen Entwicklung bis hin zum adulten Stadium ist neu.

Während der frühen postnatalen Tage war ein vorübergehendes Absinken der HDC-Expression in den postganglionären Neuronen des Ganglion oticum und sphenopalatinum, umgekehrt zu dem vorübergehenden Anstieg der TH-Expression im selben Zeitraum zu beobachten. Aus früheren Studien gibt es Hinweise darauf, dass Glukokortikoide sowohl die mRNA, als auch die Aktivität von HDC herunterregulieren können [146, 246]. Somit könnte der vorübergehende Anstieg des Plasmaspiegels zirkulierender Glukokortikoide kurz nach der Geburt (s.o.) für das vorübergehende Absinken der HDC-Expression in den neuronalen Zellkörpern des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare während dieser Phase verantwortlich sein.

In Ermangelung eines adäquaten Histamin-Antikörpers musste der Nachweis des Endproduktes Histamin, das ebenfalls von VMAT-2 in die präsynaptischen Vesikel transportiert wird, bisher ausbleiben. Die Anwesenheit von Histamin in den Neuronen kann daher nur angenommen werden, ist jedoch aufgrund der beobachteten intensiven HDC-Expression in den Mastzellen höchst wahrscheinlich.

Im Fall einer Histaminproduktion in den Neuronen des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare könnte Histamin während des Embryonalstadiums und der frühen postnatalen Stadien durch VMAT-2 in die Vesikel verpackt werden. Dies würde einen funktionellen histaminergen Phänotyp während dieser Phase bedeuten. Unter der Voraussetzung, dass VMAT-2 bis zum adulten Stadium weiter exprimiert wird, wenn auch auf sehr niedrigem Niveau, wäre ein funktioneller histaminerger Phänotyp während der gesamten prä- und postnatalen Ontogenese in den Neuronen des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare existent. Andererseits ist auch

eine nicht vesikelgesteuerte Freisetzung oder aber eine intrakrine Funktion von Histamin in Erwägung zu ziehen.

Aufgrund der Mitinnervation der nasalen Mukosa durch die neuronalen Zellkörper des Ganglion oticum und des Ganglion sphenopalatinum wäre eine Rolle des möglicherweise produzierten Histamins in der allergischen Rhinitis denkbar. Ebenso wäre eine Rolle des Histamins in der allergischen Konjunktivitis aufgrund der Innervation der Konjunktiva durch die Neurone des Ganglion sphenopalatinum denkbar. Im Fall des Ganglion submandibulare bleibt die Funktion eines eventuellen histaminergen Phänotyps in den Neuronen unklar. In der Literatur waren keine Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen Histamin und der Speichelproduktion, bzw. –sekretion zu finden.

In den Neuronen des Ganglion ciliare war HDC während der gesamten prä- und postnatalen Entwicklung konstant nur in einer Subpopulation exprimiert. Diese Tatsache ist ein Erstbefund, da in der Literatur kein Anhaltspunkt über die Expression von HDC in den Neuronen des Ganglion ciliare zu finden war. Unter der Annahme einer Histaminproduktion in diesen Neuronen wäre eine Beteiligung der putativ histaminergen Neurone des Ganglion ciliare an der Innervation von Blutgefässen in bestimmten Innervationsgebieten, wie z.B. der Konjunktiva denkbar. Pharmakologisch bekäme diese Hypothese eine Bedeutung bei der allergischen Reaktion des Auges (Chemosis).

Aufgrund der nachgewiesenen HDC-Expression auf Proteinebene in den Neuronen der vier kranialen parasympathischen Ganglien lässt sich ein histaminerger Phänotyp postulieren, zu dessen Verifikation der Nachweis von HDC auf RNA-Ebene und der direkte Nachweis von Histamin erfolgen sollte.

5.4 Bedeutung der differentiellen Peptidkodierung

Das Expressionsmuster und die Rolle von VIP in den cholinergen postganglionären Neuronen der vier kranialen parasympathischen Ganglien wurde weiter oben bereits diskutiert.

Die Expression des noradrenergen Kotransmitters Neuropeptid Y (NPY) zeigte in den Neuronen aller vier Ganglien eine deutliche Zunahme während der prä-

und postnatalen Entwicklung bis zum adulten Stadium. Frühere Studien anderer Autoren zeigten NPY-positive Nervenfasern, die aus den Neuronen des Ganglion oticum hervorgingen [113, 137]. Die Expression von NPY in den Neuronen der kranialen parasympathischen Ganglien der Ratte war bisher nur im adulten Stadium beschrieben worden. So wurden NPY-postitive Neurone im Ganglion oticum [68, 76, 112, 113, 206], im Ganglion sphenopalatinum [68, 76, 109, 112, 138, 206], im Ganglion sumbandibulare [144] und im Ganglion ciliare [76, 112, 203, 206, 219] der Ratte gefunden.

Aufgrund der bekannten stark vasokonstriktorischen Eigenschaften von NPY wäre im Ganglion oticum und sphenopalatinum eine Rolle für NPY als Neuromodulator in der parasympathischen Regulierung der zerebralen Durchblutung und für das Ganglion sphenopalatinum der Durchblutung der nasalen Mukosa und der Glandulae palatinae denkbar.

In den Neuronen des Ganglion oticum und submandibulare könnte NPY darüberhinaus bei der Regulierung der Salivation in der Glandula parotis, bzw. der Glandula submandibularis und den Glandulae sublinguales eine Rolle spielen. Anlass zu dieser Vermutung gibt eine Studie, die die Auswirkung von NPY auf die Glandula submandibularis von Hunden untersuchte [133]. Dabei trat nach Applikation von NPY sowohl eine Vasokonstriktion, als auch eine Verminderung der Speichelsekretion in der Submandibulardrüse auf. Von anderen Autoren war die Existenz parasympathischer Axone in der Glandula submandibularis und den Glandulae sublinguales in Meerschweinchen beschrieben worden, die NPY enthielten [137].

In der Literatur finden sich auch Hinweise auf das Vorhandensein von NPY-positiven Fasern in der humanen Glandula lacrimalis [182]. Ebenso wurde die Beteiligung von NPY an der sekretorischen Steuerung der Glandula lacrimalis beim Meerschweinchen postuliert [1]. Die NPYergen Neurone des Ganglion sphenopalatinum der Ratte könnten daher neben der Regulierung der zerebralen Durchblutung und der Durchblutung der nasalen Mukosa auch eine Rolle in der Regulierung der Durchblutung der Konjunktiva, sowie der Regulierung der Tränensekretion eine Rolle spielen. Die Beteiligung an der Innervation der Konjunktiva mit NPY/VIP-kopositiven Fasern aus den Neuronen des Ganglion sphenopalatinum der Ratte wurde von anderen Autoren bereits beschrieben [48].

In der Literatur sind NPY-positive Fasern in den Innervationsgebieten des Ganglion ciliare der Ratte, wie der Konkunktiva und dem Iridociliarkörper, beschrieben [18, 48, 147, 202]. Daher wäre eine Rolle von NPY als Modulator der parasympathischen Innervation der Blutgefässe dieser Organe vorstellbar.

Das Präprotachykinin Substanz P (SP), das klassischerweise in sensorischen Neuronen exprimiert ist, wurde in dieser Arbeit auch eindeutig in cholinergen Neuronen nachgewiesen. SP war in der Hauptpopulation der postganglionären Neurone des Ganglion oticum und submandibulare während der gesamten prä- und postnatalen Entwicklung bis zum adulten Stadium exprimiert. In der Literatur ist die Expression von SP bisher nur in einer sehr viel kleineren Population der Neurone des Ganglion oticum der Ratte im adulten Stadium beschrieben worden [68, 76], als in der vorliegenden Studie. Die Expression von SP in den Neuronen des Ganglion submandibulare der Ratte im adulten Stadium war in der Literatur ebenfalls beschrieben worden [144]. Eine andere Studie hingegen beschrieb eine deutliche Abnahme der SP-Expression in den Neuronen des Ganglion submandibulare der Ratte während der Ontogenese [9].
Funktionell könnte SP in den Neuronen des Ganglion oticum und submandibulare eine Rolle in der sekretorischen Innervation der Speicheldrüsen spielen. Es gibt in der Literatur mehrere Hinweise darauf, dass SP in der Glandula parotis und der Glandula submandibularis verschiedener Spezies eine Steigerung der Salivation bewirkt [47, 85, 91, 94, 217, 226]. Darüberhinaus wurde das Vorhandensein von Rezeptoren für SP an den Gefässwänden der Arterien des Circulus Arteriosus Willisii beschrieben [45]. Damit könnte die in den Neuronen des Ganglion oticum exprimierte Substanz P ebenfalls Aufgaben in der Regulierung der Gefässweite der Zerebralarterien erfüllen.
Im Gegensatz zum Ganglion oticum und submandibulare nahm die SP-Expression in den Neuronen des Ganglion sphenopalatinum und ciliare während der prä- und postnatalen Entwicklung bis zum adulten Stadium kontinuierlich ab. In den Neuronen des Ganglion ciliare verschwand die SP-Expression bis zum adulten Stadium sogar gänzlich. Bisherige Studien anderer Autoren beschränkten sich lediglich auf die Untersuchung der SP-Expression in den Neuronen des adulten Ganglion sphenopalatinum der Ratte. Hierbei wurde SP nur in einer sehr kleinen Subpopulation der Neurone des Ganglion

sphenopalatinum nachgewiesen [14, 76, 138]. Andere Autoren verneinten die Expression von SP in den Neuronen des Ganglion sphenopalatinum [68]. Für des Ganglion ciliare der Ratte war in der Literatur eine sehr geringe Anzahl SP-positiver Neurone im adulten Stadium beschrieben worden [76]. Eine Dynamik der SP-Expression in den Neuronen dieser beiden Ganglien während der prä- und postnatalen Entwicklung war bislang noch nicht beschrieben worden.
Die Abnahme der SP-Expression im Ganglion sphenopalatinum und im Ganglion ciliare während der Entwicklung könnte damit zusammenhängen, dass im Verlauf der Entwicklung eine Spezialisierung bestimmter Neuronenpopulationen innerhalb der Ganglien bezüglich der verschiedenen Innervationsgebiete stattfindet. Im Ganglion sphenopalatinum könnte dies die Reduktion der SP-positiven Neurone auf spezifische Populationen bedeuten, aus denen die Zerebralarterien, aber auch die nasale Mukosa innerviert werden. Anlass zu dieser Vermutung gab eine Studie, in der ein Zusammenhang zwischen SP und der Regulierung der nasalen Sekretion beschrieben wurde [13].

In den Neuronen des Ganglion oticum und ciliare war während der gesamten prä- und postnatalen Entwicklung bis zum adulten Stadium eine permanent hohe Expression des hauptsächlich in sensorischen Neuronen vorkommenden Calcitonin Gene-Related Peptides (CGRP) zu beobachten. Andere Autoren beschränkten sich bisher auf die Untersuchung des adulten Stadiums und berichteten hier lediglich von einer kleinen Subpopulation CGRP-positiver Neurone im Ganglion oticum der Ratte [76, 190]. Ebenso war im adulten Stadium für das Ganglion ciliare der Ratte nur eine eher kleinere Population von CGRP-positiven Neuronen beschrieben worden [76, 190, 203].
Aus der Literatur ist eine Verstärkung der SP-induzierten Steigerung der Salivation in der Glandula parotis durch CGRP bekannt [47]. Somit könnte das in den Neuronen des Ganglion oticum exprimierte CGRP, eventuell zusammen mit SP, eine Rolle in der Steuerung der Salivation spielen. Dies könnte pharmakologisch hinsichtlich der Therapie von Krankheiten mit gestörtem Speichelfluss, wie z.B. dem Sicca-Syndrom, oder der Hypersalivation bei Morbus Parkinson von Bedeutung sein.

In den Neuronen des Ganglion ciliare könnte CGRP, das ein starker Vasodiliatator ist [19a], mit der Regulierung der Durchblutung in den Innervationsgebieten des Ganglion ciliare, wie der Konkunktiva, oder des Ciliarkörpers, in Zusammenhang stehen. CGRP-positive Fasern in der Konjunktiva der Ratte wurden bereits von anderen Autoren beschrieben, die nach sensorischer Denervierung einen parasympathischen Ursprung eines Teils dieser Fasern vermuteten [121].

Interessanterweise war in den postganglionären Neuronen des Ganglion sphenopalatinum, im Gegensatz zu den Neuronen des Ganglion oticum und ciliare, während der prä- und postnatalen Entwicklung ein Absinken der CGRP-Expression bis zum adulten Stadium zu beobachten. In der Literatur war die CGRP-Expression lediglich im adulten Stadium in den Neuronen des Ganglion sphenopalatinum der Ratte untersucht worden. Hier fanden sich CGRP-positive Neurone nur in einer sehr kleinen Subpopulation [138, 190].

Die sukzessive Abnahme der CGRP-Expression in den Neuronen des Ganglion sphenopalatinum könnte auf eine Spezialisierung der CGRP-positiven Neurone auf bestimmte Zielgebiete, wie die Glandula lacrimalis oder die nasale Mukosa hindeuten. Eine solche Spezialisierung könnte auf der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren aus den Zielgebieten basieren, die sowohl eine Attraktion und Repulsion, als auch die Regulierung der Phänotypexpression der Neurone zur Folge hat. Am Beispiel der Glandula parotis, aber auch der Glandula submandibularis verschiedener Spezies wurde gezeigt, dass CGRP eine Steigerung der sekretorischen Leistung der Drüsen bewirken kann [47, 85, 91, 94, 217, 226]. Möglicherweise trifft diese CGRP-induzierte Steigerung der Drüsensekretion auch auf die Glandula lacrimalis und die nasale Mukosa zu. Dadurch wäre ein neuer pharmakologischer Ansatzpunkt in der Therapie von Krankheiten mit gestörter lacrimaler, bzw. nasaler Sekretion, wie z.B. dem Sicca-Syndrom, bzw. der allergischen Rhinitis denkbar.

Die Befunde, die in der vorliegenden Arbeit zur Expression von CGRP in den postganglionären Neuronen des Ganglion submandibulare erhoben wurden, zeigen eine erhebliche Diskrepanz zu den Befunden anderer Autoren. Bisher war die Expression von CGRP in den Neuronen des Ganglion submandibulare der Ratte nur im adulten Stadium untersucht worden. Während manche Autoren nur eine kleine Population CGRP-positiver Neurone im adulten Stadium

beschrieben [190] und andere Autoren die Existenz von CGRP in den Neuronen sogar gänzlich verneinten [144, 194], zeigen die vorliegenden Ergebnisse eine permanente Expression von CGRP in einer grossen Population der Neurone mit einer leichten Tendenz zur Abnahme während der prä- und postnatalen Entwicklung bis zum adulten Stadium. Funktionell konnte für CGRP in Arbeiten anderer Autoren eine Beteiligung an der Regulierung der Salivation im Sinne einer Steigerung der Protein- und Peroxidasesekretion der Glandula submandibularis in vitro aufgezeigt werden [172]. Möglicherweise beschränkt sich der sekretionssteigernde Effekt von CGRP in vivo nur auf den serösen oder den mukösen Teil der Glandula submandibularis. Dies würde die Expression von CGRP lediglich in einer Subpopulation der Neurone des Ganglion submandibulare erklären.
In allen vier Ganglien waren CGRP-positive Fasern in unterschiedlicher Anzahl zu sehen, die enge Kontakte mit den postganglionären Neuronen des jeweiligen Ganglions eingingen. Diese Fasern könnten auf die Existenz von Kolleteralen aus dem Ganglion trigeminale im Sinne einer möglichen sensorisch-viszeralen Kopplung hindeuten, wie sie in anderem Zusammenhang von anderen Autoren schon postuliert wurde [29, 106, 161, 199].

Die Expression des Opioidpeptids Met^5-Enkephalin-Arg^6-Gly^7-Leu^8 (MERGL), das einen ausgezeichneten Marker für enkephalinerge Neurone darstellt [108, 154, 232], nahm in den Neuronen des Ganglion oticum, sphenopalatinum und ciliare während der prä- und postnatalen Entwicklung bis zum adulten Stadium stetig zu. In den Neuronen des Ganglion submandibulare hingegen fand sich über die gesamte Entwicklung eine permanent hohe Expression von MERGL. Für die Expression von MERGL in den postganglionären Neuronen des Ganglion oticum und ciliare der Ratte war in der Literatur kein Anhaltspunkt zu finden und ist damit ein Erstbefund. In den Neuronen des Ganglion sphenopalatinum und submandibulare der Ratte war die Expression von MERGL lediglich im adulten Stadium jeweils in einer Subpopulation der Neurone beschrieben worden [138, bzw. 144, 195, 196].

MERGL, bzw. Enkephalin könnte in den Neuronen aller vier Ganglien funktionell eine Rolle in der Hemmung sensibler und nozizeptiver Nervenendigungen sowohl in den Ganglien selbst, als auch in den

Innervationsgebieten im Sinne einer sensorisch-viszeralen Kopplung (s.o.) spielen. Es ist bekannt, dass Opioide im Darm die Acetylcholinfreisetzung hemmen [34]. Unter diesem Gesichtspunkt wäre eine präsynaptische regulatorische Funktion von MERGL, bzw. Enkephalin auf die Freisetzung von Acetylcholin denkbar.

5.5 Small Intensely Fluorescent Cells (SIF Zellen)

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen zum ersten Mal einen aminergen Phänotyp der SIF Zellen in parasympathischen Ganglien, wie er in SIF Zellen in sympathischen Ganglien der Ratte bisher mehrfach beschrieben wurde [82, 83, 90, 159, 180]. In den SIF Zellen im Ganglion sphenopalatinum wurden im adulten Stadium sowohl VMAT-1, als auch VMAT-2 gefunden. Das Expressionsmuster der beiden Monoamintransporter-Isotypen war grösstenteils überlappend. Desweiteren waren die biogenen Enzyme TH, AADC und DBH jeweils in so gut wie allen Zellen exprimiert. Somit ist zumindest ein noradrenerger Phänotyp in den SIF Zellen des Ganglion sphenopalatinum anzunehmen. Den endgültigen Phänotyp (adrenerg, histaminerg, peptiderg, etc.), sowie die Funktion der SIF Zellen müssen weitere Experimente klären.

6. Zusammenfassung

Die chemischen Kodierung der klassischen und peptidergen Neurotransmission kranialer parasympathischer Ganglien der Ratte und deren Dynamik während der Ontogenese ist noch nicht vollständig klar. Hauptziel dieser Arbeit war es daher, mögliche aminerge, serotoninerge, glutamaterge und peptiderge Phänotypen in den cholinergen postganglionären Neuronen der kranialen parasympathischen Ganglien der Ratte über die Zeitachse der Ontogenese vom embryonalen bis zum adulten Stadium aufzuschlüsseln. Dazu wurden immunhistochemische Methoden, wie Fluoreszenz-Doppalmarkierung und konfokale Lasermikroskopie angewandt.

Der Nachweis der Expression wesentlicher Komponenten der aminergen Neurotransmission (des vesikulären Monoamintransporters VMAT-2, sowie der Enzyme L-aromatische Aminosäure-Decarboxylase (AADC) und Dopamin-ß-Hydroxylase (DBH)) ergab neue Evidenzen für einen entwicklungsabhängigen partiellen aminergen Phänotyp in den Neuronen des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare. Allerdings war die Tyrosin-Hydroxylase (TH), das ratenlimitierende Enzym der Katecholaminsynthese, in den Neuronen dieser Ganglien während der gesamten Entwicklung nur rudimentär exprimiert. Dagegen stieg die Expression von AADC in dieser Zeit stetig an. DBH war permanent auf hohem Niveau exprimiert. In den Neuronen des Ganglion ciliare hingegen zeigte die TH-Expression vom Embryonalstadium bis zum adulten Stadium einen kontinuierlichen Anstieg. Die Expression von AADC und DBH nahm im Zuge der prä- und postnatalen Entwicklung in den Neuronen des Ganglion ciliare stetig ab.

Aus diesen Daten ist zu schliessen, dass eine Noradrenalinsynthese in den Neuronen des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare nur unter der Voraussetzung eines Aufnahmemechanismus für L-DOPA, bzw. Dopamin, wie für die Neurone des Ganglion ciliare beschrieben, in Frage kommt. Andererseits könnte die Synthese von Noradrenalin auch über einen alternativen Stoffwechselweg durch das Enzym Tyrosinase erreicht werden. Als weitere Möglichkeit kommt die Synthese von Spurenaminen, wie z.B. Octopamin durch AADC und DBH in Betracht. Diese kompetitiven Liganden an Adrenorezeptoren mit weit geringerer Bioaktivität als Adrenalin und Noradrenalin könnten im Hinblick auf die Regulierung des zerebralen Blutflusses und der Drüsenaktivität bei

Krankheitszuständen wie Kopfschmerz oder Hypersalivation bei Morbus Parkinson von klinisch-pharmakologischer Bedeutung sein.

Die Expression von VMAT-2 nahm während der Entwicklung in den Neuronen des Ganglion oticum, sphenopalatinum und submandibulare bis zum adulten Stadium so gut wie vollständig ab. Daher könnte im adulten Stadium im Fall einer Noradrenalinsynthese einerseits eine vesikelgesteuerte Freisetzung von Noradrenalin durch VMAT-2 auf sehr niedrigem Niveau möglich sein. Andererseits kommt eine nicht vesikelgesteuerte Freisetzung des Noradrenalins in Frage.

Völlig neu war der Nachweis der Expression der Histamin-Decarboxylase (HDC) in den Neuronen aller vier kranialer parasympathischer Ganglien während der Ontogenese. Daraus ist abzuleiten, dass diese Neurone fähig sind, Histamin zu produzieren. Ob Histamin tatsächlich in den Neuronen synthetisiert und als Transmitter freigesetzt wird, bleibt ungeklärt.

Die neuerhobenen Daten zum Expressionmuster der Neuropeptide (Vesikuläres Intestinales Polypeptid (VIP), Neuropeptid Y (NPY), Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), Met^5-Enkephalin-Arg^6-Gly^7-Leu^8 (MERGL), Substanz P (SP)), sowie dem obligaten Vesikulogen Chromogranin A (CgA) in den Neuronen der vier kranialen parasympathischen Ganglien gingen teilweise weit über die in der Literatur bekannten Muster hinaus. So sind klassische sensorische Peptide, wie CGRP und SP, in sehr viel höherem Masse in den Neuronen exprimiert, als bislang beschrieben.

Als neue Beobachtung konnte der noradrenerge Phänotyp der Small Intensely Fluorescent Cells (SIF Zellen), der bisher nur in sympathischen Ganglien beschrieben war, erstmals auch in parasympathischen Ganglien aufgeschlüsselt werden. In den SIF Zellen des Ganglion sphenopalatinum waren VMAT-1 und VMAT-2, sowie TH, AADC und DBH exprimiert.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit neue Phänotypen in den Neuronen der kranialen parasympathischen Ganglien der Ratte nachgewiesen. Die neuerkannte komplexe chemische Kodierung dieser Ganglien mit verschiedenen Transmittersystemen deutet auf eine wesentlich differenziertere Rolle der parasympathischen Neurotransmission hin, als bisher beschrieben. Pathophysiologisch bedeutsam könnte dies z.B. hinsichtlich der Migräne, des Clusterkopfschmerzes, der L-DOPA-Nebenwirkungen bei Parkinsonpatienten, diverser Salivationsstörungen oder der parasympathisch-sensorischen Schmerzkontrolle sein.

7. Literatur

1 **Adeghate EA**, Singh J, Howarth FC, Burrows S **(1997)**. Control of porcine lacrimal gland secretion by non-cholinergic, non-adrenergic nerves: effects of electrical field stimulation, VIP and NPY. **Brain Res 7581:127-35**

2 **Aihara Y**, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T, Yamada S, Tomura H, Samada Y, Inoue I, Takeda J **(2000)**. Molecular cloning of a novel brain-type Na^+-dependent enorganic phosphate cotransporter. **J. Neurochem. 74:2622-2625**

3 **Altiere RJ**, Diamond L **(1983)**. Relaxant effects of vasoactive intestinal peptide and bethanechol in cat intrapulmonary artery. **Eur J Pharmacol 93:279-284**

4 **Amara SG**, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM **(1982)**. Alternative processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. **Nature 198:240-244**

5 **Anderson DJ**, Groves A, Lo L, Ma Q, Rao M, Shah NM, Sommer L **(1997)**. Cell lineage determination and the control of neuronal identity in the neural crest. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 62:493-504**

6 **Anggard A**, Lundberg JM, Lundblad L **(1983)**. Nasal autonomic innervation with special reference to peptidergic nerves. **Eur J Respir Dis Suppl 128:143-9**

7 **Arvidsson U**, Riedl M, Elde R, Meister B **(1997)**. Vesicular acetylcholine transporter (VAChT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. **J Comp Neurol 378:454-467**

8 **Asanuma M**, Miyazaki I, Ogawa N **(2003)**. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. **Neurotox Res.** 5:165-76

9 **Ayer-Le Lievre C**, Seiger A **(1984).** Parasympathetic neurons of salivary gland ganglia in the fetal and postnatal rat are substance P-like immunoreactive. **Neurosci Lett 51:287-292**

10 **Axelrod J**, Saavedra JM **(1977)**. Octopamine. **Nature 265:501-504**

11 **Bai L**, Xu H, Collins JF, Ghishan FK **(2001)**. Molecular and fuctional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. **J. Biol. Chem. 276:36764-36769**

12 **Baraniuk JN**, Kaliner M **(1991)**. Neuropeptides and nasal secretion. **Am J Physiol 261:L223-235**

13 **Baraniuk JN (2001)**. Neurogenic mechanisms in rhinosinusitis. **Curr Allergy Asthma Rep 1:252-261**

14 **Beckers HJ**, Klooster J, Vrensen GF, Lamers WP **(1991)**. Ultrastructural identification of trigeminal nerve terminals in the pterygopalatine ganglion of rats: an anterograde tracing and immunohistochemical study. **Brain Res 557:22-30**

15 **Beckers HJ**, Klooster J, Vrensen GF, Lamers WP **(1993)**. Facial parasympathetic innervation of the rat choroid, lacrimal glands and ciliary ganglion. An ultrastructural pterygopalatine tracing and immunohistochemical study. **Ophthalmic Res 25:319-330**

16 **Belhage B**, Hansen GH, Schousboe A **(1993)**. Depolarization by K+ and glutamate activates different neurotransmitter release mechanisms in GABAergic neurons: vesicular versus non-vesicular release of GABA. **Neuroscience 54:1019-34**

17 **Bellocchio EE**, Reimer RJ, Fremeau Jr RT, Edwards RH **(2000).** Uptake of glutamate into synaptic vesickles by an inorganic phosphate transporter. **Science 289:957-960**

18 **Bjorklund H**, Hokfelt T, Goldstein M, Terenius L, Olson L **(1985)**. Appearance of the noradrenergic markers tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y in cholinergic nerves of the iris following sympathectomy. **J Neurosci 5 (6):1633-40**

19 **Bleys RL**, Thrasivoulou C, Cowen T **(2001)**. Cavernous sinus ganglia are sources for parasympathetic innervation of cerebral arteries in rat. **J Cereb Blood Flow Metab 21:149-156**

19a **Brain SD**, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I **(1985)**. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilatator. **Nature 108:315-9**

20 **Brayden JE**, Conway MA **(1988)**. Neuropeptide Y and vasoactive intesinal polypeptide in cerebral arteries of the rat: relationships between innervation pattern and mechanical response. **Regul Pept 22:253-265**

21 **Brodin E**, Ekman R, Ekström J, Hakanson R, Sundler F **(1983)**. Effect of denervation on substance P and vasoactive intestinal polypeptide in rat salivary glands. **J. Physiol. (Lond) 300:67P.**

22 **Cavanagh JF**, Mione MC, Burnstock G **(1990)**. Use of enhanced silver staining combined with electron microscopical immunolabelling to demonstrate the colocalization of neurpeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in cerebrovascular nerves. **Neuroscience 39:775-785**

23 **Chiba T**, Williams TH **(1975)**. Histofluorescence characteristics and quantification of small intensely fluorescent (SIF) cells in sympathetic ganglia of several species. **Cell Tissue Res 162:331-41**

24 **Chiba T (1977)**. Monoamine-containing paraneurons in the sympathetic ganglia of mammals. **Arch Histol Jpn 40 Suppl:163-76**

25 **Chiba T**, Masuko S **(1989)**. Coexistence of multiple peptides in small intensely fluorescent (SIF) cells of inferior mesenteric ganglion of the guinea pig. **Cell Tissue Res 255:523-7**

26 **Collins F (1984)**. An effect of nerve growth factor on the parasympathetic ciliary ganglion. **J. Neurosci. 4:1281-1288**

27 **Coulombe JN**, Kos K **(1997)**. Target tissue influence on somatostatin expression in the avian ciliary ganglion. **Ann N Y Acad Sci 814:209-225**

28 **Coyle JT**, Wooten GF, Axelrod J **(1974)**. Evidence for extranoradrenergic dopamine-beta-hydroxylase activity in rat salivary gland. **J Neurochem 22:923-9**

29 **Cranford JL**, Ladner SJ, Campbell CB, Neff WD **(1976)**. Efferent projections of the insular and temporal neocortex of the cat. **Brain Res. 117(2):195-210**

30 **D'Amico-Martel A**, Noden DM **(1983)**. Contributions of placodal and neurol crest cells to avian cranial peripheral ganglia. **Amer. J. Anat. 166:445-468**

31 **David JC**, Coulon JF, Cavoy A, Delacour J **(1989)**. Effects of aging on p- and m-octopamine, catecholamines, and their metabolizing enzymes in the rat. **J Neurochem 53:149-54**

32 **Delpine L**, Aubineau P **(1997)**. Plasma protein extravasation induced in the rat dura mater by stimulation of the parasympathetic sphenopalatine ganglion. **Exp Neurol 147:389-400**

33 **Dent JA**, Davis MW, Avery L **(1997)**. avr-15 encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in Caenorhabditis elegans. **EMBO J 16:5867-5879**

34 **Dingledine R**, Goldstein A **(1976)**. Effect of synaptic transmission blockade on morphine action in the guinea-pig myenteric plexus. **J Pharmacol Exp Ther 196:97-106**

35 **Doupe AJ**, Patterson PH, Landis SC **(1985)**. Small intensely fluorescent cells in culture: Role of glucocorticoids and growth factors in their development and interconversion with other neural crest derivatives. **J. Neurosci. 5:2143-2160**

36 **Edvinsson L**, Fahrenkrug J, Hanko J, Owman C, Sundler F, Uddman R **(1980)**. VIP (vasoactive intestinal polspeptide)-containing nerves of intracranial arteries in mammals. **Cell Tissue Res 208:135-142**

37 **Edvinsson L**, Hara H, Uddman R **(1989)**. Retrograde tracing of nerve fibers to the rat middle cerebral artery with true blue: colocalization with different peptides. **J Cereb Blood Flow Metab 9:121-218**

38 **Edvinsson L (1991)**. Innervation and effects of dilatory neuropeptides on cerebral vessels. New aspects. **Blood Vessels 28:35-45**

39 **Edvinsson L (2001)**. Sensory nerves in man and their role in primary headaches. **Cephalgia 21:761-764**

40 **Edvinsson L (2001)**. Both neurogenic and vascular causes of primary headache. **Lakartidningen 98:4176-4183**

41 **Edvinsson L (2001)**. Aspects on the pathophysiology of migraine and cluster headache. **Pharmacol Toxicol 89:65-73**

42 **Edvinsson L**, Elsas T, Suzuki N, Shimizu T, Lee TJ **(2001)**. Origin and Co-localization of nitric oxide synthase, CGRP, PACAP, and VIP in the cerebral circulation of the rat. **Microsc Res Tech 53:221-228**

43 **Ehinger B**, Falck B **(1970)**. Uptake of some catecholamines and their precursors into neurons of the ciliary ganglion. **Acta Physiol. Scand. 78:132-141**

44 **Eiden LE**, Iacangelo A, Hsu CM, Hotchkiss AJ, Bader MF, Aunis D **(1987)**. Chromogranin A synthesis and secretion in chromaffin cells. **J Neurochem 49:65-74**

45 **Ekblad E**, Edvinsson L, Wahlestedt C, Uddman R, Hakanson R, Sundler F **(1984)**. Neuropeptide Y co-exists and co-operates with niradrenaline in parivascular nerve fibers. **Regul Pept 8:225-235**

46 **Ekström J**, Mansson G, Tobin G **(1982)**. Vasoactive intestinal peptide induces salivary secretion in the rat. **J Physiol 332:76-78**

47 **Ekström J**, Ekman R, Hakanson R, Sjogren S, Sundler **(1988)**. Calcitonin gene-related peptide in rat salivary glands: neuronal localization, depletion upon nerve stimulation, and effects on salivation in relation to substance P. **Neuroscience 26:933-49**

48 **Elsas T**, Edvinsson L, Sundler F, Uddman R **(1994)**. Neuronal pathways to the rat conjunctiva revealed by retrograde tracing and immunocytochemistry. **Exp Eye Res 58:117-126**

49 **Elsas T**, Uddman R, Sundler F **(1996)**. Vasoactive intestinal peptide- and nitric oxide synthase-containing nerve fibers in the rat ophthalmic artery have different origins. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 234:125-130**

50 **Erickson JD**, Eiden LE, Hoffman B **(1992)**. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. **Proc Natl Acad Sci USA 89:10993-10997**

51 **Erickson JD**, Eiden LE **(1993)**. Functional identification and molecular cloning of a human brain vesicle monoamine transporter. **J Neurochem 61:2314-2317**

52 **Erickson JD**, Varoqui H, Schäfer MK, Modi W, Diebler MF, Weihe E, Rand J, Eiden LE, Bonner TI, Usdin TB **(1994)**. Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. **J Biol Chem 269:21929-32**

53 **Erickson JD**, Eiden LE, Schäfer MKH, Weihe E **(1996)**. Reserpine- and Tetrabenazine-sensitive transport of ^{3}H-histamine by the neuronal isoform of the vesicular monoamine transporter. **J Mol Neurosci 6:277-287**

54 **Erickson JD**, Schäfer MKH, Bonner TI, Eiden LE, Weihe E **(1996)**. Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. **Proc Natl Acad Sci USA 93:5166-5171**

55 **Euler von US**, Gaddum JH **(1931)**. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. **J Physiol 72:74**

56 **Fischer-Colbrie R (1987)**. Chromogranins A, B and C: Widespread constituents of secretory vesicles. **Ann. NY Acad. Sci. 493:120-134**

57 **Fontana E**, Morin N, Prevot D, Carpene C **(2000)**. Effects of octopamine on lipolysis, glucose transport and amine oxidation in mammalian fat cells. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 125:33-44**

58 **Fremeau RT Jr**, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH **(2001)**. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excititatory synapse. **Neuron 31:247-260**

59 **Fremeau RT Jr**, Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhaben DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH **(2002)**. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. **Proc Natl Acad Sci USA 99:14488-14493**

60 **Ganten D**, Lang RE, Archelos J, Unger T **(1984)**. Peptidergic systems: effects on blood vessels. **J Cardiovasc Pharmacol;6 Suppl 4:S598-607**

61 **Gashi AA**, Borson DB, Finkbeiner WE, Nadel JA, Basbaum CB **(1986)**. Neuropeptides degranulate serous cells of ferret tracheal glands. **AM J Physiol 251:C223-229**

62 **Gerold N**, Enz A, Schroder H, Heym C **(1982)**. Biochemical analysis of catecholamines in small intensely fluorescent (SIF) cell clusters of the rat superior cervical ganglion. **J Neurosci Methods 6:287-92**

63 **Gorr S-U**, Kumarasamy R, Dean WL, Cohn DV **(1987)**. New suggestions for the physiological role of secretory protein-I. **Bone Miner. 2: 251-255**

64 **Gorr S-U**, Dean WL, Radley TL, Cohn DV **(1988)**. Calcium-binding and aggregation properties of parathyroid secretory protein-I (chromogranin A). **Bone Miner. 4:17-25**

65 **Gras C**, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mastikawy S **(2002)**. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotoninergic neurons. **J. Neurosci. 22:5442-5452**

66 **Greiling H**, Gressner A **(1995)**. Lehrbuch der Klinischen Chemie und der Pathobiochemie. **Schattauer Verlag**

67 **Grillo MA (1966)**. Electron microscopy of sympathetic tissues. **Pharmacol. Rev. 18:387-399**

68 **Grunditz T**, Uddman R, Sundler F **(1994)**. Origin and peptide content of nerve fibers in the nasal mucosa of the rats. **189:327-337**

69 **Grzanna R**, Coyle JT **(1978)**. Dopamine-beta-hydroxylase in rat submandibular ganglion cells which lack norepinephrine. **Brain Res 151:206-14**

70 **Hammond WS**, Coyle JT **(1958)**. Origin of ciliary ganglia in the chick. **J Comp. Neurol. 110:367-385**

71 **Hand JM**, Laravuso RB, Will JA **(1984)**. Relaxation of isolated guinea pig trachea, bronchi and pulmonary arteries produced by vasoactive intestinal peptide (VIP). **Eur J Parmacol 98: 279-284**

72 **Happola O**, Soinila S, Paivarinta H, Panula P, Eranko O **(1985)**. Histamine-immunoreactive cells in the superior cervical ganglion and in the coeliac-superior mesenteric ganglion complex of the rat. **Histochemistry 82:1-3**

73 **Happola O**, Paivarinta H, Soinila S, Steinbusch H **(1986)**. Pre- and postnatal development of 5-hydroxytryptamine-immunoreactive cells in the superior cervical ganglion of the rat. **J Auton Nerv Syst 15:21-31**

74 **Hara** H, Hamill GS, Jacobowitz DM **(1985)**. Origin of cholinergic nerves to the rat major cerebral arteries: coexistence with vasoactive intestinal polypeptide. **Brain Res Bul 14:179-188**

75 **Hara H**, Zhang QJ, Kuroyanagi T, Kobayashi S **(1993)**. Parasympathetic cerebrovascular innervation: an anterograde tracing from the sphenopalatine ganglion in the rat. **Neurosurgery 32:822-827**

76 **Hardebo JE**, Suzuki N, Ekblad E, Owman C **(1992)**. Vasoactive intestinal polypeptide and acetylcholine coexist with neuropeptide Y, dopamine-beta-hydroxylase, tyrosine hydroxylase, substance P or calcitonin gene-related peptide in neuronal subpopulations in cranial parasympathetic ganglia of the rat. **Cell Tissue Res 267:291-300**

77 **Hardebo JE**, Suzuki N, Owman C **(1994)**. Dynorphin B is present in sensory and parasympathetic nerves innervating pial arteries. **J Auton Nerv Syst 47:171-176**

78 **Hartschuh W**, Weihe E, Egner U **(1989)**. Chromogranin A in the mammalian Merkel cell: cellular and subcellular distribution. **J Invest Dermatol 93:641-8**

79 **Helen P**, Alho H, Hervonen A **(1980)**. Ultrastructure and histochemistry of human SIF cells and paraganglia. **Adv Biochem Psychopharmacol 25:149-52**

80 **Henry JL (1976)**. Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. **Brain Res 114:439-51**

81 **Herzog E**, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C. Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S **(2001)**. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. **J. Neurosci. 21:RC181:1-6**

82 **Heym C**, Konig R, Schroder H, Gerold N **(1981)**. Immunofluorescent and biochemical studies on dopamine-beta-hydroxylase and catecholamines in SIF cells of the superior cervical ganglion. **Acta Histochem Suppl;24:123-9**

83 **Heym C**, Common B, Yin S, Klimaschewski L, Couraud JY, Bachmann S **(1993)**. Neurochemistry, connectivity and plasticity of small intensely fluorescent (SIF) cells in the rat superior cervical ganglion. **Anat Anz 175:309-19**

84 **Heym C**, Klimaschewski L, Borghini N, Fischer-Colbrie R **(1994)**. Immunohistochemistry of small intensely fluorescent (SIF) cells and of SIF cell-associated nerve fibers in the rat superior cervical ganglion. **Microsc Res Tech 29:143-50**

85 **Higuchi Y**, Takano Y, Shimazaki H, Shimohigashi Y, Kodama H, Matsumoto H, Sakaguchi K, Nonaka S, Saito R, Waki M, et al. **(1989)**. Dimeric substance P analogue shows a highly potent activity of the in vivo salivary secretion in the rat. **Erratum in: Eur J Pharmacol 164:614**

86 **Hill CE**, Hendry IA **(1976)**. Differences in sensitivity to nerve growth factor of axon formation and tyrosine hydroxylase induction in cultured sympathetic neurons. **Neuroscience 1:489-96**

87 **Hirsch MR**, Tiveron MC, Guillemot F, Brunet JF, Goridis C **(1998)**. Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. **Development;125:599-608**

88 **Hokfelt T**, Lundberg JM, Lagercrantz H, Tatemoto K, Mutt V, Lindberg J, Terenius L, Everitt BJ, Fuxe K, Agnati L, Goldstein M **(1983)**. Occurrence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in catecholamine neurons in the human medulla oblongata. **Neurosci Lett 36:217-22**

89 **Iacangelo A**, Affolter HU, Eiden LE, Herbert E, Grimes M **(1986)**. Bovine chromogranin A: Its sequence and the distribution of its messenger RNA in endocrine tissues. **Nature 323: 82-86**

90 **Iacovitti L**, Joh TH, Albert VR, Park DH, Reis DJ, Teitelman G **(1985)**. Partial expression of catecholaminergic traits in cholinergic chick ciliary ganglia: studies in vivo and in vitro. **Dev Biol 110:402-412**

91 **Ichikawa H**, Matsuo S, Wakisaka S, Itotagawa T, Kato J, Akai M **(1990)**. Leucine-enkephalin-, neurokinin A- and cholecystokinin-like immunoreactivities in the guinea pig tongue. **Arch Oral Biol 35:181-8**

92 **Ikeda Y**, Nakao K, Yoshimasa T, Sakamoto M, Suda M, Yanaihara N, Imura H **(1983)**. Parallel distribution of methionine-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8 with methionine-enkephalin, leucine-enkephalin and methionine-enkephalin-Arg6-Phe7 in human and bovine brains. **Life Sci 33 Suppl 1:65-8**

93 **Israel M**, Manaranche R **(1985)**. The release of acetylcholine: from a cellular towards a molecular mechanism. **Biol Cell 55:1-14**

94 **Iwabuchi Y**, Masuhara T, Sofuku S **(1992)**. Sialogogic effects on rat submandibular gland of analogs of the C-terminal hexapeptide of substance P. **Jpn J Pharmacol 58:325-8**

95 **Jacobowitz DM (1967)**. Histochemical studies of the ralationships of chromaffin cells and adrenergic nerve fibers to the cardiac ganglia species. **J. Pharmacol. Exp. Ther. 158:227-240**

96 **Jacobowitz DM**, Kent KM, Fleisch JH, Cooper T **(1973)**. Histofluorescent study of catecholamine-containing elements in cholinergic ganglia from the calf and dog lung. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 144:464-466**

97 **Jacobowitz DM**, Olschowka JA **(1982)**. Bovine pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in brain and peripheral nervous system: Coexistende with catecholaminergic nerves. **Peptides 3: 569-590**

98 **Jia X**; Jia Y; Wang H; Qi W; Hou S **(1997)**. Immunohistochemical study on the distribution and coexistence of SP, VIP and NPY in the rat submandibular gland. **Chung Kuo I Hsueh Ko Hsueh Yuan Hsueh Pao 19:107-9**

99 **Kaji A**, Maeda T, Watanabe S **(1991)**. Parasympathetic innervation of cutaneous blood flow vessels examined by retrograde tracing in the rat lower lip. **J Auton Nerv Syst 32:153-158**

100 **Kanagawa-Terayama Y**, Wanaka A, Yamasaki H, Matsuyama T, Matsumoto M, Kamada, Yanaihara C, Tohyama M **(1989)**. Immunocytochemical analysis of (Met5)enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8 immunoreactive structures in the rat superior cervical ganglion. **Brain Res 494:75-84**

101 **Kandel ER**, Schwartz JH, Thomas MJ **(1995)**. Neurowissenschaften – Eine Einführung. **Spektrum Akademischer Verlag**

102 **Katz DM**, Markey KA, Goldstein M, Black IB **(1983)**. Expression of catecholaminergic characteristics by primary sensory neurons in the normal adult rat in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3526-3530**

103 **Kawa K**, Roper s **(1984)**. On the two subdivisions and intrinsic synaptic connexions in the submandibular ganglion of the rat. **J Physiol (Lond) 346:301-320**

104 Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP **(2000)**. Large dense-core secretory granule biogenesis is under the control of chromogranin A in neuroendocrine cells. **Ann N Y Acad Sci. 971:323-31**

105 Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP **(2001)**. Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. **Cell 106:499-509**

106 Kivipelto L, Panula P **(1991)**. Origin and distribution of neuropeptide-FF-like immunoreactivity in the spinal cord of rats. **J Comp Neurol 307:107-19**

107 Kobayashi S, Uchida T, Ohashi T, Fujita T, Nakao K, Yoshimasa T, Imura H, Mochizuki T, Yanaihara C, Yanaihara N, et al **(1983)**. Immunocytochemical demonstration of the co-storage of noradrenaline with Met-enkephalin-Arg6-Phe7 and Met-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8 in the carotid body chief cells of the dog. **Arch Histol Jpn 46:713-22**

108 Krekel J, Weihe E, Nohr D, Yanaihara N, Weber E **(1990)**. Distribution of Met-enkephalyl-Arg-Gly-Leu in rat larynx: partial coexistence with vasoactive intestinal polypeptide, peptide histidine isoleucine and neuropeptide Y. **Neurosci Lett 119:64-67**

109 Kuwayama Y, Emson PC, Stone RA **(1988)**. Pterygopalatine ganglion cells contain neuropeptide Y. **Brain Res 446:219-224**

110 Landis SC, Patterson PH **(1981)**. Neural crest lineages. **Trends Neurosci. 4:172-175**

111 Landis SC, Jackson PC, Fredieu JR, Thibault J **(1987)**. Catecholaminergic properties of cholinergic neurons and synapses in adult rat ciliary ganglion. **J Neurosci 7:3574-3587**

112 Leblanc GG, Trimmer BA, Landis SC **(1987)**. Neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat cranial parasymathetic neurons: coexistence with vasoactive intestinal peptide and choline acetyltransferase. **Proc Natl Acad Sci USA 84:3511-3515**

113 Leblanc GG, Landis SC **(1988)**. Target specifity of Neuropeptide Y-immunoreactive cranial parasympathetic neurons. **J. Neurosci. 8:146-155**

114 Leblanc GG, Landis SC **(1989)**. Differentiation of noradrenergic traits in the principal neurons and small intensely flourescent cells of the parasympathetic sphenopalatine ganglion of the rat. **Dev. Biol. 131:44-49**

115 Lee RY, Sawin ER, Chalfie M, Horvitz HR, Avery L **(1999)**. EAT-4, a homolog of a mammalian sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter, is necessary for glutamatergic neurotransmission in Caenorhabditis elegans. **J. Neurosci. 19:159-167**

116 Lee SH, Iwanaga T, Fujita T **(1995)**. Intraepithelial nerve fibers in the nasal mucosa of the rat with special reference to the localization of CGRP, VIP and nitric oxide (NO). **Arch Histol Cytol 58:449-456**

117 Lee Y, Takami K, Kawai Y, Girgis S, Hillyard CJ, MacIntyre I, Emson PC, Tohyama M **(1985)**. Distribution of calcitonin gene-related peptide in the rat peripheral nervous system with reference to its coexistence with subsance P. **Neuroscience 15:1227-1237**

118 Liggins GC (1976). Adrenocortical-related maturational events in the fetus. **Amer. J. Obstet. Gynecol. 126:931-938**

119 Lindberg I, Yang HY **(1984)**. Distribution of Met5-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8-immunoreactive peptides in rat brain: presence of multiple molecular forms. **Brain Res 299:73-8**

120 Liu Y, Peter D, Roghani A, Schuldinger S, Prive G, Eisenberg D, Brecha N, Edwards R **(1992)**. A cDNA that suppresses MPP^+ toxicity encodes a vesicular amine transporter. ***Cell* 70:539-551**

121 Luhtala J, Palkama A, Uusitalo H **(1991)**. Calcitonin gtene-related peptide immunoreactive nerve fibers in the rat conjunctiva. **Invest Ophthalmol Vis Sci 32:640-645**

121a Lundberg JM, Hökfelt T, Schultzberg M, Uvnas-Wallensten K, Kohler C, Said SI **(1979)**. Occurence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactivity in certain cholinergic neurons of the cat: evidence from combined immunohistochemistry and acetylcholinesterase staining. **Neuroscience 4:1539-59**

122 Lundberg JM, Änggard A, Fahrenkrug J, Hökfelt T, Mutt V **(1980)**. Vasoactive intestinal poklypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: functional significance of coexisting transmitters for vasodilatation and secretion. **Proc. Nat. Acad. Sci. 77:1651-1655**

123 Lundberg JM, Änggard A, Fahrenkrug J **(1981)**. Complementary role of vasoactive intestinal peptide (VIP) and acetylcholine for cat submandibular gland blood flow and secretion. **Acta Physiol Scand 113:329-336**

124 Lundberg JM, Terenius L, Hokfelt T, Martling CR, Tatemoto K, Mutt V, Polak J, Bloom S, Goldstein M **(1982).** Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. **Acta Physiol Scand 116:477-80**

125 Lundberg JM, Hökfelt T, Änggard A, Terenius L, Elde R, Markey K, Goldstein M, Kimmel J **(1982)**. Organizational principles in the peripheral sympahtetic nervous system: Subdivision by coexisting peptides (somatostatin-, avian pancreatic polypeptide-, and vasoactive intestinal polypeptide-like, immunoreactive materials). **Proc. Natl. Acad. Sci USA 79:1303-1307**

126 Lundblad L, Lundberg JM, Brodin E, Anggard A **(1983)**. Origin and distribution of capsaicin-sensitive substance P-immunoreactive nerves in the nasal mucosa. **Acta Otolaryngol 96:485-93**

127 Lundberg JM, Fahrenkrug J, Larsson O, Änggard A **(1984)**. Co-release of vasoactive intestinal polypeptide and peptide histidine isoleucine in relation to atroine-resistant vasodilation in cat submandibular salivary gland. **Neurosci Lett 52:37-42**

128 Lundberg JM, Fahrenkrug J, Hökfelt T, Martling CR, Larsson O, Tatemoto K, Änggard A **(1984)**. Co-existence of peptide HI (PHI) and VIP in nerves regulating blood flow and bronchial smooth muscle tone in various mammals including man. **Peptides 5:593-606**

129 Lundberg JM, Martling CR, Hökfelt T **(1988)**. Airways, oral cavity and salivary glands: classical transmitters and peptides in sensory and autonomic motor neurons. In: (ed. by) Björklund A, Hökfelt T and Owman C: Handbook of chemical neuroanatomy, Vol. 6: The peripheral nervous system. **Elsvier, Amsterdam (p. 391-444)**

130 Malis DD, Lacroix JS **(2000)**. Evaluation of various antagonists of CGRP, a neuromediator implicated in the inflammatory mechanisms of nasal mucosa. **Schweiz Med Wochenschr 125:96S-98S**

131 Martin CE, Cake MH, Hartmann PE, Cook IF **(1977)**. Relationship between foetal corticosteroids, maternal progesterone and parurition in the rat. **J. Anat. 105:255-282**

132 Max SR, Schwab M, Dumas M, Thoenen H **(1978)**. Retrograde axonal transport of nerve growth factor in the ciliary ganglion of the chick and the rat. **Brain Res. 159:411-415**

133 McCloskey MJ, Potter EK **(2000)**. Sympathetic and parasympathetic interaction in vascular and secretory control of salivary glands in anaesthetised dogs. **Auton Neurosci. 84:50-7**

134 McDonald DM, Blewett RW **(1981)**. Location and size of carotid body-like organs (paraganglia) revealed in rats by the permeability of blood vessels to Evan´s blue dye. **J. Neurocytol. 10:607-643**

135 Minami Y, Kimura H, Aimi Y, Vincent SR **(1994)**. Projections of nitric oxide synthase-containing fibers from the sphenopalatine ganglion to cerebral arteries in the rat. **Neuroscience 60:745-759**

136 Morin X, Cremer H, Hirsch MR, Kapur RP, Goridis C, Brunet JF **(1997)**. Defects in sensory and autonomic ganglia and absence of locus coeruleus in mice deficient for the homeobox gene Phox2a. **Neuron 18:411-23**

137 Morris JL, Kondo M, Gibbins IL **(1997)**. Selective innervation of different target tissues in guinea-pig cranial exocrine glands by sub-populations of parasympathetic and sympathetic neurons. **J Auton Nerv Syst 66:75-86**

138 Motosugi H, Chiba T, Konno A, Kaneko T **(1992)**. Distribution of neuropeptides in rat pterygopalatinie ganglion: light and electron microscopic immunohistochemical studies. **Arch Histol Cytol 55:513-524**

139 Müller F, Rohrer H **(2002)**. Molecular control of ciliary neuron development: BMPs and downstream transcriptional control in the parasympathetic lineage. **Development 129:5707-17**

140 Mutt V, Said SI **(1974)**. Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide: the amino-acid sequence. Use of kallikrein in its determitation. **Europ J Biochem 42:581-589**

141 Nakai M, Tamaki K, Ogata J, Matsui Y, Maeda M **(1993)**. Parasympathetic cerebrovasodilator center of the facial nerve. **Circ Res 72:470-475**

142 Ni B, Rosteck Jr PR, Nadi NS, Paul SM **(1994)**. Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na^+-dependent inorganic phosphate cotransporter. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5607-5611**

143 Nieber K; Oehme P **(1982)**. Substance P - a neuropeptide transmitter. **Z Gesamte Inn Med 37:577-82**

144 Ng YK, Wong WC, Ling EA **(1995)**. A study of the structure and functions of the submandibular ganglion. **Ann Acad Med Singapore 24:793-801**

145 Nohr D, Michel S, Fink T, Weihe E **(1995)**. Pro-enkephalin opioid peptides are abundant in porcine and bovine splenic nerves, but absent from nerves of rat, mouse, hamster, and guinea-pig spleen. **Cell Tissue Res 281:143-52**

146 Oh C, Nakano K **(1988)**. Inhibition by glucocorticoids of mitogen-dependent histamine biosynthesis caused by histidine decarboxylase in cultured mouse spleen cells and peritoneal adherent cells. **Immunology 65:433-6**

147 Ohia SE, Jumblatt JE **(1990)**. Inhibitory effects of neuropeptide Y on sympathetic neurotransmission in the rabbit iris-ciliary body. **Neurochem Res 153:251-6**

148 Okina A, Abe K, Inuzuka H, Yano T, Okina T, Nakashima T, Nishiura T **(1992)**. The effects of m-octopamine on salivary flow rates and protein secretion by rat submandibular glands. **Comp Biochem Physiol C 103:469-76**

149 Okina A, Abe K, Tashiro M, Ishibashi K (**1993)**. The effects of p-octopamine on salivary flow rates and protein secretion by rat submandibular glands. **J Dent Res 72:993-1000**

150 Otsuka M; Yanagisawa M **(1990)**. Pain and neurotransmitters. **Cell Mol Neurobiol 10:293-302**

151 Paivarinta H, Happola O, Joh TH, Steinbusch H, Watanabe T, Panula P **(1987)**. Immunocytochemical colocalization of histamine, histidine decarboxylase, 5-hydroxytryptamine and tyrosine hydroxylase in the superior cervical ganglion of the rat. **Histochem J 19:319-26**

152 Papka RE, Traurig HH, Klenn P **(1987)**. Paracervical ganglia of the female rat: histochemistry and immunohistochemistry of neurons, SIF cells, and nerve terminals. **Am J Anat 179:243-57**

153 Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C, Brunet JF **(1999)**. The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. **Nature 399:366-70**

154 Peatfield AC, Barnes PJ, Bratcher C, Nadel JA, Davis B **(1983)**. VIP simulates tracheal submucosal gland secretion in ferret. **Am Rev Respir Dis 128:89-93**

155 Peter D, Jimenez J, Liu Y, Edwards R **(1994)**. The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors. **J Biol Chem 269:7231-7237**

156 Peter D, Liu Y, Sternini C, de Giorgio R, Brecha N, Edwards R **(1995**). Differential expression of two vesicular monoamine transporters. **J Neurosci 15:6179-6188** ***337***

157 Piotrowski W, Foreman JC **(1986)**. Some effects of calcitonin gene-related peptide in human skin and on histamine release. **Br J Dermatol 114:37-46**

158 Pittius CW, Seizinger BR, Pasi A, Mehraein P, Herz A **(1984)**. Distribution and characterization of opioid peptides derived from proenkephalin A in human and rat central nervous system. **Brain Res 304:127-36**

159 Prud'homme MJ, Houdeau E, Serghini R, Tillet Y, Schemann M, Rousseau JP **(1999)**. Small intensely fluorescent cells of the rat paracervical ganglion synthesize adrenaline, receive afferent innervation from postganglionic cholinergic neurones, and contain muscarinic receptors. **Brain Res 821:141-9**

160 Przewlocki R, Lason W, Silberring J, Herz A, Przewlocka B **(1986)**. Release of opioid peptides from the spinal cord of rats subjected to chronic pain. **NIDA Res Monogr 75:422-425**

161 Radmilovich M, Fernandez A, Trujillo-Cenoz O **(1997)**. Localization of NADPH-diaphorase containing neurons in the spinal dorsal horn and spinal sensory ganglia of the turtle Chrysemys d'orbigny. **Exp Brain Res:113:455-64**

162 Reiffen FU, Gratzl M **(1986)**. Ca^{2+} binding to chromaffin vesicle matrix proteins: Effects of pH, Mg^{2+}, and ionic strength. **Biochemistry 25:4402-4406**

163 Reiffen FU, Gratzl M **(1986)**. Chromogranins, widespread in endocrine and nervous tissue, bind Ca^{2+}. **FEBS Letts. 195:327-330**

164 Rios M, Habecker B, Sasaoka T, Eisenhofer G, Tian H, Landis S, Chikaraishi D, Roffler-Tarlov S **(1999)**. Catecholamine synthesis is mediated by tyrosinase in the absence of tyrosine hydroxylase. **J Neurosci. 19:3519-26**

165 Roghani A, Feldman J, Kohan SA, Shirzadi A, Gundersen CB, Brecha N, Edwards RH **(1994)**. Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. **Proc Natl Acad Sci USA 91:10620-10624**

166 Rosa P, Hille A, Lee RWH, Zanini A, De Camilli P, Huttner WB **(1985)**. Secretogranins I and II: Two tyrosine-sulfated secretory proteins common to a variety of cells secreting peptides by the regulated pathway. **J. Cell Biol. 101:1999-2011**

167 Rosenfeld MG, Amara SG, Roos BA, Ong ES, Evans RM (1981). Altered expression of the calcitonin gene associated with RNA polymorphism. **Nature 290:63-5**

168 Rossi J, Tomac A, Saarma M, Airaksinen MS **(2000)**. Distinct roles for GFRalpha1 and GFRalpha2 signalling in different cranial parasympathetic ganglia in vivo. **Eur J Neurosci 12:3944-52**

169 Saavedra JM, Axelrod J **(1976)**. Octopamine as a putative neurotransmitter. **Adv Biochem Psychopharmacol 15:95-110**

170 Sabbadini E, Berczi I **(1995)**. The submandibular gland: a key organ in the neuro-immuno-regulatory network? **Neuroimmunomodulation 2:184-202**

171 Said SI, Mutt V **(1970)**. Polypeptide with broad biological activity: Isolation from small intestine. **Science 169:1217-1218**

172 Salo A, Uusitalo H **(1989)**. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the regulation of salivary secretion. **Proc Finn Dent Soc 85:333-7**

173 Salo A, Virta E, Uusitalo H **(1995)**. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its effects on protein release in vitro in the developing submandibular gland of the rat. **Regul Pept 55:155-165**

174 Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez J, Garcia-Canovas F, Garcia-Carmona F **(1995)**. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. **Biochim Biophys Acta 1247:1-**

175 Schäfer MKH, Nohr D, Romeo H, Eiden LE, Weihe E **(1994)**. Pan-neuronal expression of chromogranin A in rat nervous system. **Peptides 15:263-279**

176 Schäfer MK, Weihe E, Varoqui H, Eiden LE, Erickson JD **(1994)**. Distribution of the vesicular acetylcholine transporter (VAChT) in the central and peripheral nervous systems of the rat. **J Mol Neurosci 5:1-26**

177 Schäfer MKH, Weihe E, Erickson, JD Eiden LE **(1995)**. Human and monkey cholinergic neurons visualized in paraffin-embedded tissues by immunoreactivity for VAChT, the vesicular acetylcholine transporter. **J. Mol. Neurosci. 6:225-235**

178 Schäfer MKH, Eiden LE, Weihe E **(1998)**. Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholinetransporter. II. The peripheral nervous system. **Neuroscience 84:361-376**

179 Schäfer MK, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD **(2002)**. Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. **J Biol Chem 277:50734-50748**

180 Schütz B, Schäfer MKH, Eiden LE, Weihe E **(1998)**. Vesicular amine transporter and isoform selection in developing brain, peripheral nervous system and gut. **Brain Res Dev Brain Res 106:181-204**

181 Schultz T, Soinila J, Tolonen R, Happola O, Uusitalo H, Salo A **(1994)**. The sympathetic and parasympathetic nature of neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibres in the major salivary glands of the rat. **Histochem J 26:563-70**

182 Seifert P, Stuppi S, Spitznas M, Weihe E **(1996)**. Differential distribution of neuronal markers and neuropeptides in the human lacrimal gland. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2344:232-40**

183 Senba E, Yanaihara C, Yanaihara N, Tohyama M **(1989)**. Proenkephalin opioid peptide product in the sensory ganglia of the rat: a developmental immunohistochemical study. **Brain Res Dev Brain Res 48:263-271**

184 Seylaz J, Hara H, Pinard E, Mraovitch S, MacKenzie ET, Edvinsson L **(1988)**. Effect of stimulation of the sphenopalatine ganglion on cortical blood flow in the rat. **J Cereb Blood Flow Metab 8:875-878**

185 Sharkey KA, Templeton D **(1984)**. Substance P in the rat parotid gland: Evidence for a dual origin from the otic and trigeminal ganglia. **Brain Res. 304:392-396**

186 Shida T, Ueda Y, Ishida-Yamamoto A, Senba E, Tohyama M **(1991)**. Enkephalinergic sympathetic and parasympathetic innervation of the rat submandibular and sublingual glands. **Brain Res 555:288-294**

187 Shimizu T (1994). Distibution and pathway of the cerebrovascular nerve fibers from the otic ganglion in the rat: anterograde tracing study. **J Auton Nerv Syst 49:47-54**

188 Shimizu T, Koto A, Suzuki N, Morita Y, Takao M, Otomo S, Fukuuchi Y **(1999)**. Occurence and distribution of substance P receptors in the cerebral blood vessels of the rat. **Brain Res 830:372-378**

189 Siegrist G, Dolivo M, Dunant Y, Foroglou-Kerameus M, DeRibaupierre F, Rouiller C **(1968)**. Ultrastrcture and function of the chromaffin cells in the superior cervical ganglion of the rat. **J. Ultrastruct. Res. 25:381-407**

190 Silverman JD, Kruger L **(1989)**. Calcitonin-gene-related-peptide-immunoreactive innervation of the rat head with emphasis on specialized sensory structures. **J Comp Neurol 280:303-330**

191 Simon J-P, Bader MF, Aunis D **(1988)**. Secretin from chromaffin cells is controlled by chromogranin A-derived peptides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:1712-1716**

192 Simons E, Smith PG **(1994)**. Sensory and autonomic innervation of the rat eyelid: neuronal origins and peptide phenotypes. **J Chem Neuroanat 7:35-47**

193 Singh S, Johnson PI, Javed A, Gray TS, Lonchyna VA, Wurster RD **(1999)**. Monoamine- and histamine-synthesizing enzymes and neurotransmitters within neurons of adult human cardiac ganglia. **Circulation 99:411-9**

194 Soinila J, Salo A, Uusitalo H, Yanaihara N, Happola O **(1989)**. CGRP-immunoreactive sensory nerve fibers in the submandibular gland of the rat. **Histochemistry 91:455-**

195 Soinila J, salo A, Uusitalo H, Soinila S, Yanaihara N, Happola O **(1991)**. Met5-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8-immunoreactive nerve fibers in the major salivary glands of the rat: evidence for both sympathetic and parasympathetic origin. **Cell Tissue Res 264:15-22**

196 Soinila J, Happola O, Yanaihara N, Soinila S **(1991)**. Immunohistochemical licalization of (Met5)enkephalin and (Met5)enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8 in sympathetic and parasympathetic neurons and nerve fibers projecting to the rat submandibular gland. **Neuroscience 40:545-554**

197 Soinila S (1984). Clustering of intensely fluorescent sympathetic cells in embryonal and postnatal rats. **J Auton Nerv Syst 11:207-22**

198 Soinila S, Ahonen M, Joh TH, Steinbusch HW **(1988)**. 5-Hydroxytryptamine and catecholamines in developing sympathetic cells of the rat. **J Auton Nerv Syst 22:193-202**

199 Stehberg J, Acuna-Goycolea C, Ceric F, Torrealba F **(2001)**. The visceral sector of the thalamic reticular nucleus in the rat. **Neuroscience106:745-55**

200 Stjarne P, Lundblad L, Anggard A, Hokfelt T, Lundberg JM **(1989)**. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide: co-existence in sensory nerves of the nasal mucosa and effects on blood flow. **Cell Tissue Res 256:439-46**

201 Stone RA. (1986). Vasoactive intestinal polypeptide and the ocular innervation. **Invest Ophthalmol Vis Sci. 27:951-7**

202 Stone RA, Laties AM, Emson PC **(1986)**. Neuropeptide Y and the ocular innervation of rat, guinea pig, cat and monkey. **Neuroscience 17:1207-16**

203 Stone RA, McGlinn AM, Kuwayama Y, Grimes PA **(1988)**. Peptide immunoreactivity of the ciliary ganglion and ist accessory cells in the rat. **Brain Res 475:389-392**

204 Suzuki N, Hardebo JE, Owman C **(1988)**. Origins and pathways of cerebrovascular vasoactive intestinal polypeptide-positive nerves in rat: **J Cereb Blood Flow Metab 8:697-712**

205 Suzuki N, Hardebo JE, Owman C **(1990)**. Origins and pathways of choline acetyltransferase-positive parasympathetic nerve fibers to cerebral vessels in rat. **J Cereb Blood Glow Metab 10:339-408**

206 Suzuki N, Hardebo JE, Kahrstrom J, Owman C **(1990)**. Neuropeptide Y co-exists with vasoactive intestinal polypeptide and acetylcholine in parasympathetic cerebrovascular nerves originating in the sphenopalatine, otic, and internal carotid ganglia of the rat. **Neuroscience 36:507-519**

207 Suzuki N, Hardebo JE, Kahrstrom J, Owman C **(1990)**. Selective electrical stimulation of postganglionic cerebrovascular parasympathetic nerve fibers originating from the sphenopalatine ganglion enhances cortical blood flow in the rat. **J Cereb Blood Flow Metab 10:383-391**

208 Suzuki N, Hardebo JE, Owman C **(1989)**. Trigeminal fibre collaterals storing substance P and calcitonin gene-related peptide associate with ganglion cells containing choline acetyltransferase and and vasoactive intestinal polypeptide in the sphenopalatine ganglion of the rat. An axon reflex modulating parasympathetic ganglionic activity? **Neuroscience 30:595-604**

209 Sze PY, Hedrick BJ **(1983)**. Effects of dexamethasone and other glucocorticoid steroids on tyrosine hydroxylase activity in the superior cervical ganglion. **Brain Res. 265:81-6**

210 Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R **(2000)**. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. **Nature 407:189-194**

211 Takamori S, Malherbe P, Broger C, Jahn R **(2002)**. Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. **EMBO Rep 3:798-803**

212 Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R **(2001)**. Identification of differention-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). **J. Neurosci 21:RC182:1-6**

213 Tatemoto K (1982). Neuropeptide Y: Complete amino acid sequence of the brain peptide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5485-5489**

214 Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V **(1982)**. Neuropeptide Y – A novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. **Nature 296:659-660**

215 Tatemoto K, Efendic S, Mutt V, Makk G, Feistner GJ, Barchas JD **(1985)**. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. **Nature 324:476-478**

216 Tervo T, Tervo K, Eranko L **(1982)**. Ocular neuropeptides. **Med Biol. 60:53-60**

217 Tobin G, Luts A, Sundler F, Ekstrom J **(1990)**. Peptidergic innervation of the major salivary glands of the ferret. **Peptides 11:863-7**

218 Trepel M Neuroanatomie **Urban & Schwarzenberg 1995**

219 Tyrrell S, Siegel RE, Landis SC **(1992)**. Tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y are increased in ciliary ganglia of sympathectomized rats. **Neuroscience 47:985-989**

220 Uddman R, Malm L, Sundler F **(1981)**. Peptide containing nerves in the nasal mucosa. **Rhinology 19:75-79**

221 Uddman R, Malm L, Sundler F **(1983)**. Substance-P-containing nerve fibers in the nasal mucosa. **Arch Otorhinolaryngol 238:9-16**

222 Uddman R, Hara H, Edvinsson L **(1989)**. Neuronal pathways to the rat middle meningeal artery revealed by retrograde tracing and immunocytochemistry. **J Auton Nerv Syst 26:69-75**

223 Uddman R, Edvinsson L **(1989)**. Neuropeptides in the cerebral circulation. **Cerebrovasc Brain Metab Rev 1:230-252**

224 Uddman R, Edvinsson L, Hara H **(1989)**. Axonal tracing of autonomic nerve fibers to the superficial temporal artery in the rat. **Cell Tissue Res 256:559-565**

225 Uddman R, Grunditz T, Kato J, Sundler F **(1998)**. Distribution and origin of nerve fibers in the rat temporomandibular joint capsule. **Anat Embryol (Berl) 197:273-282**

226 Ueha T, Nemoto A, Kurihara K **(1989)**. Studies on the salivary secretion induced by substance P in perfused submandibular gland of rat. **Proc Finn Dent Soc 85:345-53**

227 Uemura Y, Sugimoto T, Nomura S, Nagatsu I, Mizuno N **(1987)**. Tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity and catecholamine fluorescence in ciliary ganglion neurons. **Brain Res 416:200-203**

228 Varma DR, Deng XF, Chemtob S, Nantel F, Bouvier M Can **(1995)**. Characterization of the vasorelaxant activity of tyramine and other phenylethylamines in rat aorta. **J Physiol Pharmacol 73:742-6**

229 Varoqui H, Schäfer MK, Zhu H, Weihe E, Erickson JD **(2002)**. Identification of the differentiation-associated Na+/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. **J Neurosci. 22:142-55**

230 Virta E, Uusitalo H **(1993)**. Development of substance P and neurokinin A immunoreactivity in ganglia supplying nerves to the submandibular glands of the rat. **Histochemistry 100:311-318**

231 Warwick R, Williams PL, eds. **(1973)**. Gray´s Anatomy. **Saunders, Philadelphia**

232 Weihe E, Millan MJ, Leibold A, Nohr D, Herz A **(1988)**. Co-localization of proenkephalin- and prodynorphin-derived opioid peptides in laminae IV/V spinal neurons revealed in arthritic rats. **Neurosci Lett 85:187-92**

233 Weihe E, Krekel J **(1991)**. The neuroimmune connection in human tonsils. **Brain Behav Immun 5:41-54**

234 Weihe E, Nohr D, Michel S, Müller S, Zentel HJ, Fink T, Krekel J **(1991)**. Molecular anatomy of the neuro-immune connection. **Int J Neuroscience 59:1-23**

235 Weihe E, Schäfer MK, Erickson JD, Eiden LE **(1994)**. Localization of vesicular monoamine transporter isoforms (VMAT1 and VMAT2) to endocrine cells and neurons in rat. **J Mol Neurosci 5:149-164**

236 Weihe E, Tao-Cheng JH, Schäfer MK, Erickson JD, Eiden LE **(1996)**. Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in chlinergic nerve terminals and its targeting to a specific populaiton of small synaptic vesicles. **Proc Natl Acad Sci USA 93:3547-3552**

237 Weihe E, Anlauf M, Schäfer MKH, Hartschuh W, Eiden LE **(1998)**. VMAT2 is the transporter mediating sequestration of monoamines in rat, human platelets, mast cells and cutaneus dendritic cells. **Neuroscience A301.1**

238 Weihe E, Eiden LE **(2000)**. Chemical neuroanatomy of the vesicular amine transporters. **FASEB J. 2000 14:2435-49**

239 White DM; Walker S; Brenneman DE; Gozes I **(2000)**. CREB contributes to the increased neurite outgrowth of sensory neurons induced by vasoactive intestinal polypeptide and activity-dependent neurotrophic factor. **Brain Res 868:31-8**

240 White PM, Morrison SJ, Orimoto K, Kubu CJ, Verdi JM, Anderson DJ **(2001)**. Neural crest stem cells undergo cell-intrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals. **Neuron 29:57-71**

241 Williams THW (1967). Electron microscopic evidence for an autonomic interneuron. **Nature 214:309-310**

242 Yamauchi A, Yokota R, Fujimaki Y **(1975)**. Reciprocal synapses between cholinergic axons and small granule-containing cells in the rat cardiac ganglion. **Anat. Rec. 181:195-209**

243 Yanaihara N; Kanno T; Asada N; Iwanaga T; Jun L; Nagasawa S; Yanaihara C **(2000)**. VIP- and PACAP-induced salivary chromogranin A secretion in the isolated perfused submandibular gland of rats. **Ann N Y Acad Sci;921:218-25**

244 Yang PC, Liu T; Zhang TY; Fan DS **(1998).** Effect of substance P on the short-circuit current of rat nasal mucosal epithelium. **Ann Otol Rhinol Laryngol 107:675-9**

245 Yang YF; Yang LH; Shi GP; Han QD **(1993)**. Platelet neuropeptide Y and its vasoconstriction effect in rat. **Sheng Li Hsueh Pao 45:400-4**

246 Zahnow CA, Panula P, Yamatodani A, Millhorn DE **(1998)**. Glucocorticoid hormones downregulate histidine decarboxylase mRNA and enzyme activity in rat lung. **Am J Physiol 275:L407-13**

247 Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR **(1999)**. Fundamental Neuroscience. **Academic Press**

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
A.	Arteria
AADC	L-aromatische Aminosäure-Decarboxylase
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CgA	Chromogranin A
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
DAB	Diaminobenzidin
DBH	Dopamin-ß-Hydroxylase
d.h.	das heisst
E	Embryonalstadium
(F)	Verdünnung für Fluoreszenz-Doppelmarkierung
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HDC	Histidin-Decarboxylase
ICC	Immunhistochemie
i.e.	id est
IgG	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
M	molar

mM	millimolar
MERGL	Met^5-Enkephalin-Arg^6-Gly^7-Leu^8
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N.	Nervus
Ni	Nickel
NPY	Neuropeptid Y
P	Postnatalstadium
PNMT	Phenylethanolamin-*N*-Methyltransferase
s	Sekunde
SERT	Serotonin-Membrantransporter
SIF	small intensely fluorescent
s.	siehe
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
SP	Substanz P
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TH	Tyrosin-Hydroxylase
TpH	Tryptophan-Hydroxylase
VAChT	vesikulärer Acetylcholintransporter
VGLUT	vesikulärer Glutamattransporter
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

8.2 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Christian Brett
Adresse:	Sonnenblickallee 13 35039 Marburg
Telefon:	06421 - 917 662
Mobil:	0172 – 769 38 70
E-mail:	christian.brett@web.de
Geburtsdatum:	18.02.1974
Geburtsort:	Freiburg im Breisgau
Familienstand:	ledig

Ausbildung

1980 – 1984	Grundschule Staufen
1984 – 1993	Faust-Gymnasium Staufen
1993	Abitur
1993 – 1993	Freiwilliges Soziales Jahr in der urologischen Klinik und der orthopädischen Klinik der Albert-Ludwig-Universität Freiburg
1994	Beginn des Medizinstudiums an der Philipps-Universität Marburg
2000 – 01	Praktisches Jahr Chirurgie: Tribhuvan Univerity Teaching Hospital, Kathmandu, Nepal Orthopädie: Orthopädische Klinik Kassel Innere Medizin: DRK-Krankenhaus Kassel
2001	3. Staatsexamen

Wissenschaftliche Tätigkeiten

1998	Beginn der Doktorarbeit bei Prof. Dr. E. Weihe in der Abteilung Molekulare Neurowissenschaften am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg Titel der Arbeit: „Chemische Kodierung der Neurotransmission in den kranialen parasympathischen Ganglien der Ratte während der Ontogenese“

	Erlernte Methoden: Immunhistochemie (DAB/Nickel-verstärkt und Fluoreszenz), mikroskopische Dissektion
2002 – 03	Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Marburg, AG Prof. Weihe

Veröffentlichungen

„From the cholinergic gene locus to the cholinergic neuron."
Weihe E, Schäfer MK, Schütz B, Anlauf M, Depboylu C, Brett C, Chen L, Eiden LE
J Physiol Paris. 1998 Oct-Dec;92(5-6):385-8

Abstract for **"Expression of Aminergic Traits During Development"** by Lee E. Eiden, Martin K.-H. Schäfer, Ruslan Damadzic, Martin Anlauf, Burkhard Schütz, Christian Brett and Eberhard Weihe
Moscow Symposium "Neuron Differentiation and Plasticity—Regulation by Intercellular Signals"

Lehrtätigkeit

als Student:	Kurs der makroskopischen Anatomie (2x) Kurs der Neuroanatomie
als Assistent	Kurs der mikroskopischen Anatomie Kurs der makroskopischen Anatomie Kurs der Neuroanatomie

Auslandsaufenthalte

1998	4 Wochen Cardiothoracic Surgery an der University of San Diego, USA im Rahmen einer Famulatur
2000	3 Wochen Lehrtätigkeit und wissenschaftliche Mitarbeit am National Institut Of Health, Bethesda, USA bei Dr. L. Eiden im Rahmen eines Projektes von Prof. Weihe / Dr. Eiden
2000/01	Chirurgie-Tertial an der Tribhuvan Universität Kathmandu, Nepal

8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Arnold, Aumüller, Bartsch, Barth, Bartalanffy, Basler, Baum, Bauer, Beato, Berger, Besedovky, Berndt, Bien, Bittinger, Brilla, Czubayko, Cetin, Daut, Donner-Banzhoff, Doss, Effendy, Ehlenz, Eissele, Elsässer, Engel, Engelhardt-Cabillic, Ernst, Eschenbach, Fehmann, Feuser, Fischer, Fruhstorfer, Fuhrmann, Ganz, Gemsa, Geus, Göke, Görg, Gohlenhofen, Gotzen, Grau, Greger, Gressner, Grezeschick, Griss, Gropp, Habermehl, Happle, Hartmann, Hasilik, Hasse, Havemann, Heeg, Hellwig, Herzum, Heufelder, Hildebrandt, Hilgermann, Hoffmann, Hofmann, Huffmann, Jones, Josef, Kaffarnik, Kälble, Kalbfleisch, Katschinski, Kern, Kienapfel, Kleine, Kleinsasser, Klenk, Klose, Koehler, Koolmann, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Lang, Lange, Lennarz, Lill, Lorenz, Löffler, Lührmann, Maisch, McGregor, Meinhardt, Mennel, Mittag, Moll, Mönnikes, Moosdorf, Mühlberger, Müller R., Müller U., Mutters, Netter, Neubauer, Neumann, Nies, Niessing, Noll, Oertel, Peter, Pfab, Pfeiffer, Pohlen, Portig, Prinz, Radsak, Remschmidt, Rheder, Richter, Riedmiller, Rogausch, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schachtschabel, Schlegel, Schmidt, Schnabl, Schüffel, Schulz, Schwarz, Seifart, Seitz J., Seitz R., Seyberth, Simon, Sommer, Slenczka, Steininger, Stinner, Sodomann, Strempel, Sturm, Teinmetz, Strempel, Thomas, Vogt, Vohland, Voigt, Wagner H.J., Wagner U., Weihe, Werner, Wesemann, Westermann, von Wichert, Wilke, Wolf, Zelder

8.4 Danksagung

Folgenden Personen, die zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich danken:

Ausdrücklich Herrn Prof. Dr. Eberhard Weihe als Initiator und Betreuer dieser Arbeit für das zur Verfügung stellen dieses interessanten Themas und für die Einführung und Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten. Auch für sein grosses Engagement in der Betreuung dieses wissenschaftlichen Projektes möchte ich ihm herzlich danken!

Herrn Dr. Burkhard Schütz für die Einführung in das Thema der vorliegenden Arbeit, sowie das Vermitteln der präparatorischen Fähigkeiten, die notwendig waren, das Ganglienmateriel zu gewinnen.

Ferner den wissenschaftlichen Mitarbeitern, Herrn Dr. Michael Bette, Frau Dr. Anette Bieller, Frau Dr. Joanna Mika, Herrn Dr. Martin Schäfer und Herrn PD Dr. Reiner Westermann, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und mir zu Vorbildern im wissenschaftlichen Arbeiten geworden sind.

Meinen beiden Kollegen Uwe Schneider für seine tatkräftige und vor allem geduldige Hilfe bei der Bewältigung von Problemen mit allerlei Computerprogrammen und Christian Ulke, der mir ebenfalls immer tatkräftig zur Seite stand und ein Vorbild wissenschaftlichen Arbeitens war.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Heidemarie Schneider für die Anfertigung der exzellenten Fotos! Ein weiterer besonderer Dank geht an Frau Elke Rodenberg-Frank und Frau Marion Zibuschka für die grosse Hilfestellung und Unterstützung bei der Laborarbeit!
Ebenso ein herzlicher Dank an Frau Petra Lattermann ,Frau Heike Reichert-Preibsch und Frau Eva Sack, für ihre Hilfestellung im Labor.