

Aus dem Physiologischen Institut
der Universität Würzburg
Lehrstuhl II
Vorstand: Professor Dr. rer. nat. Andreas Karschin

Histologie und Funktion der Kniegelenksinnervation der Maus
Eine Studie über Anzahl und Größenverteilung der Nervenfasern sowie
über Mechanotransduktion der primär sensorischen Spinalganglienzellen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Martin Ebinger
aus Bonn

Würzburg, April 2002

Referent: Prof. em. Dr. R. F. Schmidt, Ph. D., D. Sc. h. c.

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Koepsell

Dekan: Univ.-Prof. Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Liebsten: Monika, Heinz und Biene

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1. Die Innervation des Kniegelenks	1
2. Modalitätsspezifische Transduktion	1
3. Das Soma als adäquates Modell der Nervenendigungen	2
4. Die Strategie	3
Material und Methoden	5
1. Untersuchungen der Nervenfasern	5
2. Untersuchungen der Spinalganglienzellen	6
2.1 Retrograde Markierung von Gelenksafferenzen	6
2.2 Ganglionektomie	6
2.3 Zellkultur	7
2.4 Ca ²⁺ -Imaging	8
2.5 Elektrophysiologie	10
2.6 Statistische Absicherung	10
Ergebnisse	11
1. Aufbau der Gelenknerven	11
1.1 Anzahl der Nervenfasern	11
1.2 Größenverteilung der Nervenfasern	12
1.3 Validität	13
2. Größe und Funktion der Spinalganglienzellen	14
2.1 Größenverteilung der Spinalgangliensomata	14
2.2 Reaktion auf hypotonen Stimulus	14
2.3 Reaktion auf Capsaicin	17
2.4 Membranpotential	19
Diskussion	21
1. MAN und PAN der Maus im Vergleich mit anderen Spezien	21
2. Funktionelle Anatomie	24
2.1 Charakterisierung der Nervenfasern aufgrund ihrer Durchmesser	24
2.2 Charakterisierung der Spinalganglienzellen aufgrund ihrer Größe	25

3. Physiologie	27
3.1 $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen bei hypotoner Stimulierung	28
3.2 Heterogenität kultivierter mechanosensitiver Neuronen	29
3.3 Capsaicin-Sensitivität	31
3.4 Membranpotential	33
Ausblick	35
Zusammenfassung	35
Literaturverzeichnis	37

Einleitung

1. Die Innervation des Kniegelenks

Das Kniegelenk von Katzen und Ratten ist ein etabliertes Modell für Untersuchungen der sensorischen Funktionen artikulärer Afferenzen. Seine Innervation obliegt vorwiegend einem medialen artikulären Nerven (MAN) und einem posterioren artikulären Nerven (PAN) (Gardener, 1944; Skoglund, 1956; Freeman und Wyke, 1967). Die Zusammensetzung dieser Nerven wurde licht- und elektronenmikroskopisch bei Katzen und Ratten untersucht (Heppelmann et al., 1988; Hildebrand et al., 1991). Aufgrund genetischer Manipulationsmöglichkeiten gewann jedoch besonders die Maus zunehmend an experimenteller Bedeutung. Pathophysiologische Prozesse wie Arthritis wurden an ihr untersucht (Khoa et al., 1999; Rintala et al., 1977; Rosloniec et al., 1997). Über die Innervation des Kniegelenks der Maus ist aber noch wenig bekannt. Nach retrograder Markierung mit Fluoro-Gold von Spinalganglien in zwei Monate alten Mäusen wurden 238 ± 80 (Mittelwert \pm Standardabweichung) Gelenksafferenzen gefunden (Salo und Tatton, 1993).

2. Modalitätsspezifische Transduktion

Form und Funktion: Sensoren, die mechanische Deformationen registrieren, geben ihre Erregung in Form von Aktionspotentialen an Nervenfasern weiter. Die Sensoren mit ihrer spezifischen Anatomie und ihren speziellen Afferenzen, die die Verbindung zum zentralen Nervensystem herstellen, determinieren unsere Empfindungen und somit unser Weltbild. Zellkörpergröße, Nervenfaserdurchmesser, Nervenleitungsgeschwindigkeit und sensorische Modalität eines Neurons korrelieren innerhalb gewisser Grenzen (Fyffe, 1983; Harper und Lawson, 1985; Lawson und Waddell, 1991; Yaksh und Hammond, 1982). Messungen der Somagröße und der Leitungsgeschwindigkeit der dazugehörigen Axone zeigten, dass schnell leitende Spinalganglienneuronen die größten Zellkörper besitzen, während langsamer leitende kleinere Somata aufweisen (Harper und Lawson, 1985). Diese Studien lassen vermuten, dass große Spinalganglienneuronen propriozeptive und taktile Informationen übermitteln und kleine Zellkörper für Temperatur und Schmerz zuständig sind (Fyffe, 1983;

Yaksh und Hammond, 1982). Mechanosensitive Zellen sind jedoch bei weitem noch nicht ausreichend identifiziert. Insbesondere die Mechanismen der Mechanotransduktion sind noch weitgehend ungeklärt.

Transduktion: Neuere Forschungsergebnisse haben zwar das Verständnis der Transduktionsprozesse in verschiedenen sensorischen Neuronen wie z. B. Photorezeptoren (Benndorf K. et al., 1999), Haarzellen des Gehörs (Harada N. et al., 1994), Geschmacks- (Gilbertson T. A. et al., 2000) und Geruchszellen (Vogl A. et al., 2000) vertieft. Doch nach wie vor ist unklar, wie die Transduktion in primär somatisch sensorischen Afferenzen vonstatten geht. Ein besonderes Hindernis bei der Erforschung dieser Prozesse liegt in der extrem geringen Größe peripherer sensorischer Nervenendigungen.

3. Das Soma als adäquates Modell der Nervenendigungen

Zellkörper: Da viele Membranrezeptoren auch in den Membranen der Zellkörper exprimiert werden, wurden Untersuchungen an den Somata anstelle der schwer zugänglichen Nervenendigungen vorgenommen. So dienten Spinalganglienneuronen der Erforschung peripherer Nozizeption (Burgess et al., 1989; Kano et al., 1994; Mc Guirk et al., 1989 und 1992). Doch auch in diesem Zusammenhang ist wenig über mechanische Transduktion bekannt.

Mechanosensible Kanäle: Durch Veränderung des extrazellulären osmotischen Druckes können schnelle Schwankungen des Zellvolumens bewirkt werden. Aus einer Zunahme des Volumens einer Zelle in hypotonem Medium resultiert zwangsläufig eine Dehnung der Membran. Mechanische Stimulierung sorgt in einer Vielzahl von Zellen für einen Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration ($=[\text{Ca}^{2+}]_{iz}$): In nicht wenigen Zellen ist hypoosmotische Schwellung mit einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{iz}$ verbunden (Oike et al., 1994; Chen et al., 1996; Altamirano et al., 1998). Einen ähnlichen Anstieg vermerkten Harada et al. (1994) in kochleären Haarzellen.

In Barorezeptorneuronen der Aorta führt die Dehnung der Zellmembran über Gadolinium-sensible Kanäle zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration (Cunningham et al., 1995; Sullivan et al., 1997).

In einer anderen Studie an Barorezeptoren wurde epithelialen Natrium-Kanälen eine bedeutende Rolle für die Mechanotransduktion beigemessen (Drummond et al., 1998).

Ein mechanotransduktorischer Kanal ist erst vor kurzem in *Drosophila* geklont worden; dieser Kanal scheint bei Invertebraten spezifisch in mechanosensitiven Neuronen exprimiert zu werden (Walker et al., 2000).

Spinalganglienzellen: An Spinalganglienneuronen wurden mechanosensitive Chloridkanäle gefunden (Imai et al., 2000). Hier spielen verschiedene dehnungsaktivierte Kanäle eine Rolle (Garcia-Añoveros und Corey, 1997).

Gotho und Takahashi (1999, 2000) kamen in Studien an Spinalganglienneuronen von Ratten zu dem Schluss, dass mechanische Stimulierung über mechanosensitive Kalziumkanäle zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ führt. Für derartige Veränderungen der $[Ca^{2+}]_{iz}$ machten McCarter et al. (1999) die Öffnung von dehnungsaktivierten Kanälen im Zellsoma verantwortlich.

Trigeminalganglienzellen: Viana et al. (2001) teilten Trigeminalganglienneuronen entsprechend dem Zeitverlauf der Kalzium-Reaktion bei hypotoner Stimulierung in drei Gruppen auf; es wurden nicht reagierende Zellen von solchen unterschieden, die entweder schnell und mit hoher Amplitude oder langsam und mit niedriger Amplitude antworteten. Während der Reizung wurden eine Erhöhung der Leitfähigkeit und eine Depolarisation festgestellt.

4. Die Strategie

Innovation: In den funktionellen Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal identifizierte Kniegelenksafferenzen zur Erforschung von Veränderungen der intrazellulären Kalzium-Konzentrationen während mechanischer Reizung verwendet.

Histologie: Der Form, als Voraussetzung der Funktion, wurde ebenfalls große Aufmerksamkeit gewidmet: Um eine detaillierte morphologische Grundlage für physiologische Studien an Kniegelenksafferenzen zu schaffen, wurden zunächst der MAN und der PAN elektronenmikroskopisch untersucht. Neben der Anzahl der Nervenfasern wurden die Durchmesser- und myelinisierte Verteilung der myelinisierten und der unmyelinisierten Nervenfasern bestimmt. Die zuvor unbekannte Innervation des Kniegelenks der Maus wurde beschrieben und die Ergebnisse wurden mit den von Katzen und Ratten bekannten Daten verglichen. Auch die Flächen der zugehörigen Somata wurden bestimmt.

Strategie: Schaible und Grubb legten 1993 dar, daß die Hauptsensation des Gelenks Schmerz (Nozizeption) ist. Im Kniegelenk beschrieben sie überwiegend

hochschwellige Sensoren. Anhand dieser Afferenzen gezielt die der Mechano-transduktion zugrundeliegenden Prozesse zu untersuchen, ist die Strategie der vorliegenden Arbeit.

Technik: Mittels retrograder Markierung wurden die Zellkörper der Kniegelenksafferenzen in den Spinalganglien der Mäuse auffindig gemacht, um ihre Größe zu bestimmen und an ihnen funktionelle Versuche durchzuführen.

Um einen Beitrag zum Verständnis intrazellulärer Mechanismen nozizeptiver Rezeptoren zu leisten, wurden Kalzium-Antworten (und elektrophysiologische Daten) auf Zellschwellung in hypotonem Medium analysiert. Zusätzlich wurde die Polymodalität der Zellen durch Exposition gegenüber Capsaicin untersucht.

Material und Methoden

1. Untersuchungen der Nervenfasern

Insgesamt wurden sechs Mäuse (CD 1) im Alter von drei Monaten zur morphologischen Untersuchung der Nervi articulares des Kniegelenks verwendet.

Perfusion: Die tief anästhesierten Tiere wurden über den linken Ventrikel mit warmer, heparinhaltiger Tyrode-Lösung (pH 7,4) mit einem Druck von 120 mm Hg perfundiert. 20 Sekunden später folgte bei einem Druck von 60 bis 120 mm Hg für etwa 10 Minuten Dauer eine Fixationslösung, die 6 % Paraformaldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,2) enthielt.

Exzision: Nach der Perfusion wurde ein 2 mm-Segment des PAN entnommen. Aufgrund seiner geringen Größe ließ sich der MAN nicht separat entnehmen. Stattdessen wurde der gesamte Gewebeblock zwischen dem Nervus saphenus und dem Kniegelenk unter Mitnahme des MAN und des ihn umgebenden Muskelgewebes exzidiert.

Fixation: Die Nervensegmente und Gewebsblöcke wurden über Nacht in der oben genannten Fixationslösung aufbewahrt und anschließend in 2 % Osmium Tetroxid- und 1,5 % Kalium Ferrizyanid-Lösung in 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,2) für eine Stunde nachfixiert (Langford und Coggeshall, 1980). Nach langsamer Dehydrierung mit 50 % und 70 % Ethanol wurden die Gewebsblöcke mit 1 % Uranyl-Azetat in 70 % Ethanol eine Stunde lang gefärbt. Danach wurden sie mittels Ethanol und Propylenoxid weiter dehydriert und schließlich in einer Mischung aus Epon 812 und Araldite (1:1) eingebettet.

Elektronenmikroskopie: Das Gewebe wurde mit Hilfe einer Diamantenklinge an einem Reichert-Ultracut perpendicular zur Längsachse der Nerven ultradünn geschnitten und auf Formvar-beschichteten Netzchen (Gilder grids, Typ G200HH) aufbewahrt. Sie wurden mit einem Zeiss-Elektronenmikroskop (EM 902) untersucht. Jeder Nerv wurde bei 3000facher Vergrößerung fotografiert. Die Anzahl der Nervenfasern wurde anhand der Photographien bestimmt. Ihre Durchmesser wurden aus Querschnittsflächen, die zu Kreisen konvertiert wurden, errechnet (Karnes et al., 1977).

Validität: Um die Validität der Methode sicherzustellen, wurden die verschiedenen Schritte auch an zwei Ratten durchgeführt. Für Ratten lagen entsprechende Daten (Hildebrand et al., 1991) vor, die als Vergleich dienten. Dabei

ging es um die Frage, ob die Methodik gültige Ergebnisse liefern kann. Als Kriterium galt die Reproduktion ähnlicher Daten bei den Ratten.

2. Untersuchungen der Spinalganglien

2.1 Retrograde Markierung von Gelenksafferenzen

Zehn weibliche Mäuse (OF1 ICO) im Alter von einem Monat mit einem Gewicht zwischen 18 und 25 g wurden zur Untersuchung der Spinalgangliensomata verwendet.

Anästhesie: Die Tiere wurden mit etwa 0,05ml/ 10g Körpergewicht eines intraperitoneal applizierten Gemisches aus Xylocain und Ketamin (0,15 ml Xylocain, Astra Zeneca, und 0,21 ml Curamed, Karlsruhe, in 4,64 ml Salzlösung) anästhesiert. Die Tiefe der Narkose wurde mittels eines sicher noxischen Reizes an der Hinterpfote überprüft.

Färbung: Nach einem kleinen Hautschnitt über dem Ligamentum patellae wurden unter Verwendung einer Hamilton-Spritze drei µl eines fluoreszierenden Farbstoffes (zwei mg von entweder 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylin-Docarbocyanin (DiI) oder Fast Blue - Sigma F-5756, Lot 117H0388 - gelöst in 100 µl DMSO) durch das Ligament in die Kniekapsel injiziert (Hanesch und Heppelmann, 1995). Anschließend wurden die Hautschnitte per Naht verschlossen und die noch anästhesierten Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt, wo sie nach einiger Zeit erwachten.

2.2 Ganglionektomie

Wirbelsäulenentnahme: Zwei Tage später wurden die Tiere auf die gleiche Weise anästhesiert, ein großer Hautlappen an Rücken und dorsolateralem Oberschenkel scharf abpräpariert und der Nervus ischiadicus aufgesucht. Der Nerv wurde bis zu seinem Austritt aus den Foramina intervertebralia zurückverfolgt. Anschließend wurde die Wirbelsäule bei L1 und S1 durchtrennt und der dazwischen liegende Abschnitt aus dem Tier en bloc reseziert. Kurz nach dem Eingriff verstarben die anästhesierten Tiere.

Ganglienentnahme: Die entnommene Wirbelsäule wurde in auf Eis gelagerter Phosphate Buffer Saline-Lösung (PBS, Sigma) gewaschen und dann in

Dublecco's modified Eagle's medium (D-MEM, Sigma) überführt, um auf ganzer Länge in sagittaler Richtung durchtrennt zu werden. In einer sterilen Bank wurden unter mikroskopischer Kontrolle die Ganglien aus den Foramina intervertebralia entnommen, in dafür bereitgestelltes D-MEM mit 50 µg/ml Gentamycin überführt und mit Pinzette und Federschere von Bindegewebe befreit.

2.3 Zellkultur

Kollagenase: Anschließend wurden die Ganglien in 15 ml F12 Medium (88 ml F12 + 10 ml hitzeinaktiviertes Pferdeserum + 0,3 ml Aminosäuren 0,5 ml L-Glutamin + 1 ml Penicillin/ Streptomycin + 100 µl Nervenwachstumsfaktor (NGF, mouse-7s, Sigma) mit 48,5 mg Kollagenase (260 U/mg) gegeben. Es folgte eine Inkubation von 60 Minuten Dauer bei 37 °C, 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid.

Trypsin: Die Ganglien wurden dann mit D-PBS gewaschen und für 11 Minuten in 3 ml Trypsin erneut inkubiert. Daraufhin wurden sie vorsichtig mit einer an der Flamme geglätteten Pasteurpipette trituriert, bis die Zellverbände makroskopisch nicht mehr erkennbar waren.

Zentrifuge: Die Suspension wurde auf Percoll (2,092 ml Percoll; 6,914 ml Aqua a. i.; 0,964 ml PBS 10x) und anschließend in 3 ml D-MEM zentrifugiert (2500 U/min für je 7 und 10 min).

Inkubation: Das Pellet wurde in 50 µl F12+ Medium mit 100 ng/ml NGF gelöst und in Plastikpetrischalen auf runden Deckgläschen verteilt, die zuvor mit Poly-L-Lysine (0,01 %, Sigma) beschichtet und in der sterilen Bank getrocknet wurden. Die Petrischalen wurden inkubiert (37 °C, 95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid). Nachdem sich die Zellen nach 12 Stunden am Boden abgesetzt hatten, wurden vorsichtig 2 ml F12 Medium mit 100 ng/ml Nerven Wachstums Faktor hinzugegeben.

Überprüfung: Nach maximal 48 Stunden wurden die Deckgläschen dem Experimentierstand zugeführt. Hier wurden die Deckgläschen mit einem Skalpell zerbrochen, um die Zellen auf mehrere Versuche verteilen zu können. Mit Hilfe eines Mikroskops wurden die Neuronen auf ihren Zustand und ihre etwaige Fluoreszenz hin überprüft (Abbildung 1). Dazu wurden den Farbstoffen DiI und Fast Blue entsprechend unterschiedliche Filter verwendet.

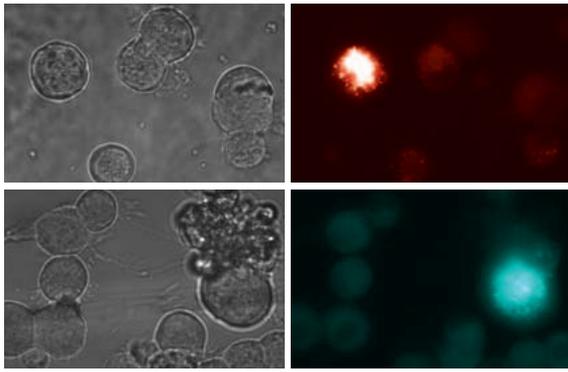


Abbildung 1. Links: Photographien von Spinalganglienneuronen in Zellkultur. Rechts: Photographien der gleichen Bildausschnitte unter UV-Beleuchtung. Die rot aufleuchtende Zelle wurde mit dem Farbstoff DiI, die grün aufleuchtende Zelle mit Fast Blue in vivo retrograd markiert. Der Farbstoff wurde den Tieren zwei Tage vor der Ganglionektomie unter Anästhesie in die Kniegelenkscapseln injiziert.

2.4 Ca²⁺-Imaging

Osmotischer Stimulus: Als hypotoner Stimulus wurden Lösungen verwendet, deren Osmolalität mit einem kryoskopischen Osmometer (Gnotec, Berlin, Deutschland) bestimmt wurde. Um eine konstante ionale Zusammensetzung zu gewährleisten, wurde ausschließlich die Konzentration des D-Mannitols variiert. Das Weglassen von Mannitol führte zu einer osmotischen Reduktion auf 70 % der isotonen Lösung, also von 314 mOsm/kg auf 209 mOsm/kg. Die einzelnen Bestandteile sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Perfusion: Die Zellen wurden in der Aufnahmekammer gleichmäßig (2 - 4 ml/min) mit isotoner Lösung umspült. Durch die Verwendung eines Hahn-systems mit mehreren Schläuchen konnte die Perfusion auf eine beliebige Testlösung umgeschaltet werden. Innerhalb von 20 bis 30 Sekunden wurde eine Lösung durch die folgende komplett ausgetauscht.

Fura2: Um die $[Ca^{2+}]_{iz}$ messen zu können, wurden die Zellen auf den Deckgläschen mit dem Acetoxymethylester von Fura2 (Fura2-AM, Molecular Probes, Eugene, USA) beladen. Die Neuronen wurden für 30 Minuten in oxygenierter Lösung mit Fura2-AM (5 bis 10 μ M mit 0,02 % Pluronic acid) bei 37 °C, 95 % O₂ und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen vorsichtig mit oxygenierter Salzlösung gewaschen und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Bildgebung: Teile der Coverslips wurden in einer Kammer, die ein Volumen von 0,5 ml aufwies, plaziert und bei 32 ± 2 °C kontinuierlich mit oxygenierter Lösung perfundiert. Die Zellen wurden an einem Mikroskop (Axioskop FS, Zeiss) durch ein 60 x Wasser-Immersion-Objektiv (Olympus; NA = 0,90) beobachtet. Die fluorometrischen Messungen wurden durch ein digitales Bildverarbeitungssystem, eine gekühlte CCD-Kamera (Sensys, Photometrics) und ein Image Lightning 2000 video imaging board (Axon Instruments, CA,

Osmolalität (mOsm/ kg)	Isoton (314) (mM)	Hypoton (314) (mM)
NaCl	74,0	74,0
KCl	5,0	5,0
KH ₂ PO ₄	1,2	1,2
MgSO ₄	1,3	1,3
CaCl ₂	2,4	2,4
NaHCO ₃	26,0	26,0
Glukose	10,0	10,0
D-Mannitol	100,0	0,0

Tabelle 1. Zusammensetzung der beiden verwendeten Lösungen unterschiedlicher Osmolalität. Lediglich durch die Zugabe von Mannitol unterschieden sich die Lösungen.

USA) ermöglicht. Die Darstellung der Bilder wurde durch AIW Software (Axon Instruments) unterstützt. Zur Exzitation wurden Wellenlängen von 357 nm und 380 nm verwendet. Als Lichtquelle diente eine 50 W Quecksilberlampe. Um eine Ausbleichung zu minimieren, wurde mittels eines neutralen Dichtefilters die Intensität des anregenden Lichts verändert. Der Verlust an Fluoreszenz während der Aufnahmen betrug durchschnittlich $3 \pm 0,3$ % pro Minute (n=24). Die Umschaltung auf beide Wellenlängen wurde durch ein computergesteuertes Filterrad (Lambda 10-2; Sutter Instruments, CA, USA) erreicht. Fluoreszierende Emissionen bei Wellenlängen über 510 nm wurden registriert. Alle fünf Sekunden wurde ein Bild aufgenommen und abgespeichert. Die Hintergrundfluoreszenz wurde in einem zellfreien Bereich der Deckgläschen gemessen und digital von den zellulären Fluoreszenzsignalen subtrahiert.

Reizantwort: Als Beginn einer Reizantwort wurde eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration um 10 % vom Ausgangswert definiert. Dies war nötig, um physiologische Schwankungen der intrazellulären Kalziumkonzentration nicht als Reaktionsbeginn fehlzudeuten.

Fläche: Die Flächen der kultivierten Spinalganglienzellen der Mäuse wurden ebenfalls bestimmt. Aufnahmen der Neuronen vor jeglicher Reizung und unter normaler Belichtung dienten der Größenbestimmung. Hierzu wurde der Mittelwert aus dem jeweils größten und kleinsten gemessenen Zelldurchmesser gebildet. Nach der Formel $(\pi \times d^2)/4$ wurden die Flächen errechnet.

2.5 Elektrophysiologie

Es wurden Patch-Pipetten aus Borosilikat-Glas (Clark, UK) mit einem Widerstand von 3 bis 8 M Ω verwendet. Die Membranpotentiale wurden unter Strom-Klemm-Bedingungen mit einem RK300-patch-clamp-Verstärker (Biologic, Myelan, Frankreich) gemessen. Die Datensammlung wurde mittels der Programme pCLAMP 6-8 (Axon Instruments) bewerkstelligt. Die Standardpipettenlösung enthielt (in mM): 140 KCl, 10 NaCl, 4 Mg-ATP, 0,4 Na-GTP und 10 HEPES (300 mOsm/kg, pH 7,3 eingestellt mit KOH). Nach dem Ruhepotential von -60 mV ab, wurden die Zellen de- oder hyperpolarisiert, bis es bei etwa -60 mV lag.

2.6 Statistische Absicherung

Die Ergebnisse wurden mittels Student's t-Test überprüft, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurde.

Ergebnisse

1. Aufbau der Gelenknerven

1.1 Anzahl der Nervenfasern

PAN: Der Nervus tibialis aus dem Nervus ischiadicus gab in der Fossa poplitea den PAN als einzelnen Ast ab. Dieser war von einem Perineurium umgeben und enthielt bisweilen ein zentrales Blutgefäß (Abbildung 2). Der Nerv war aus 195 ± 50 größtenteils unmyelinisierten Nervenfasern (Mittelwert \pm Standardabweichung, Bereich 149 bis 295 Nervenfasern) zusammengesetzt (Tabelle 2). Der PAN enthielt 92 bis 149 unmyelinisierte (Mittelwert 129) und 48 bis 116 myelinisierte (Mittelwert 66) Nervenfasern (Tabelle 2).

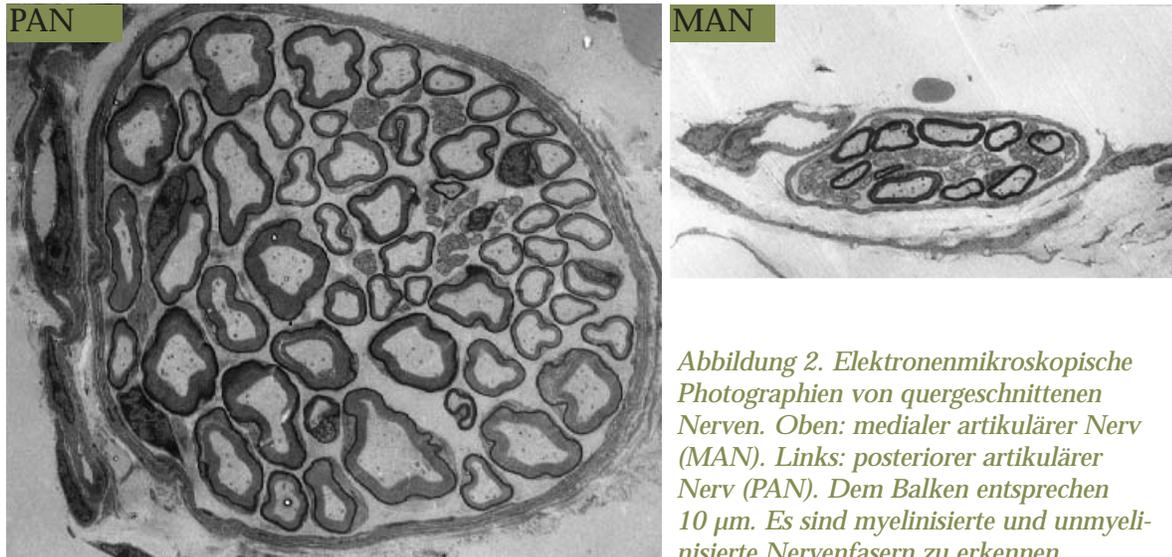


Abbildung 2. Elektronenmikroskopische Photographien von querschnittenen Nerven. Oben: medialer artikulärer Nerv (MAN). Links: posteriorer artikulärer Nerv (PAN). Dem Balken entsprechen 10 μ m. Es sind myelinisierte und unmyelinisierte Nervenfasern zu erkennen.

MAN: In dem für die Untersuchung des medialen artikulären Nervens entnommenen Gewebe fanden sich ein bis drei kleinere Äste, die von einem mindestens zweilagigen Perineurium umgeben waren. Der mediale artikuläre Nerv enthielt 75 ± 28 Nervenfasern (Bereich 46 bis 110), die sich aus 63 unmyelinisierten (Bereich 37 bis 90) und 12 myelinisierten (Bereich 6 bis 24) Nervenfasern zusammensetzten (Tabelle 2).

MAN und PAN: Insgesamt erreichten 270 ± 78 Nervenfasern ein Kniegelenk der Maus über den größeren posterioren und den kleineren medialen artikulären Nerven. 78 ± 30 dieser Nervenfasern waren myelinisiert und 192 ± 52 waren unmyelinisiert (Tabelle 2).

	MAN (n=8)	PAN (n=7)	Anzahl der Nerven- fasern pro Gelenk
unmyelinisierte Nervenfasern	63 ± 24	129 ± 28	192 ± 52
myelinisierte Nervenfasern	12 ± 6	66 ± 24	78 ± 30
Anzahl insgesamt pro Nerv	75 ± 28	195 ± 50	270 ± 78

Tabelle 2. Zusammensetzung des MAN und PAN aus myelinisierten und unmyelinisierten Nervenfasern. Die Daten stammen von 8 MAN und 7 PAN aus 6 adulten Mäusen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardabweichung.

1.2 Größenverteilung der Nervenfasern

Unmyelinisierte Nervenfasern: Der Durchmesser der unmyelinisierten Nervenfasern wurde bei 992 Fasern des posterioren artikulären Nervens und 480 Fasern des medialen artikulären Nervens bestimmt. Die unimodale Verteilung der unmyelinisierten Nervenfasern glich sich bei beiden Nerven (Abbildung 3). Sie reichte von 0,1 bis 1,2 µm mit einem Maximum zwischen 0,3 und 0,6 µm (Abbildung 3).

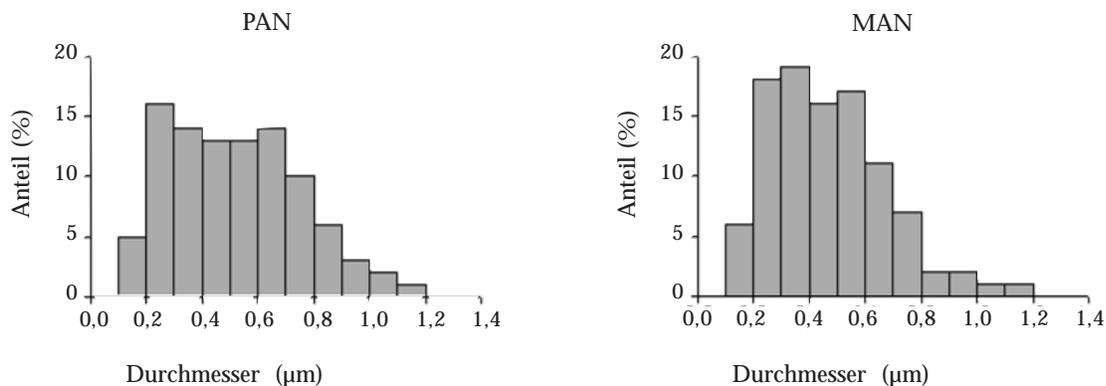


Abbildung 3. Durchmesserverteilung der unmyelinisierten Nervenfasern im PAN (links) und im MAN (rechts). Die verwendeten Daten stammen von 480 (MAN) und 992 (PAN) Nervenfasern aller untersuchten Nerven.

Myelinisierte Nervenfasern: Die Größe der myelinisierten Nervenfasern wurde bei je 563 Fasern des posterioren artikulären Nervens und 94 Fasern des medialen artikulären Nervens untersucht. Diese Verteilung unterschied sich bei beiden

Nerven. Im posterioren artikulären Nerven reichten die Durchmesser von 1 bis 12 μm mit einem Maximum bei 3 bis 5 μm (Abbildung 4). Für den medialen artikulären Nerven ergaben sich Größen zwischen 1 und 8 μm mit einem Maximum zwischen 2 und 5 μm (Abbildung 4).

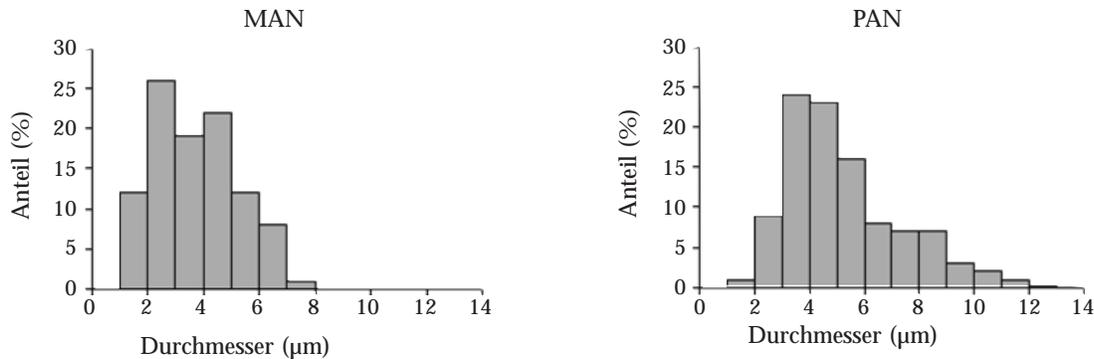


Abbildung 4. Durchmesserverteilung der myelinisierten Nervenfasern im medialen (links) und im posterioren artikulären Nerven (rechts). Die verwendeten Daten stammen von 94 Nervenfasern aus dem MAN und 563 Nervenfasern aus dem PAN aller untersuchten Nerven.

1.3 Validität

PAN der Ratte: In dem rechten PAN einer Ratte fanden sich 458 unmyelinisierte Nervenfasern. Er wies 105 myelinisierte Nervenfasern auf. Die unimodale Größenverteilung der unmyelinisierten Nervenfasern reichte in diesem Nerv von 0,2 bis 1,3 μm und wies bei dem Durchmesser von 0,7 μm ein Maximum auf. Die myelinisierten Nervenfasern verteilten sich ihrer Größe nach im PAN zwischen 3 und 12 μm . Das Maximum lag zwischen 4 und 5 μm .

MAN der Ratten: Der MAN (n=4) der Ratten war aus 145 ± 54 unmyelinisierten und 30 ± 9 myelinisierte Nervenfasern zusammengesetzt. Die Größenverteilung der unmyelinisierten Nervenfasern im MAN der Ratten reichte von 0,1 bis 1,1 μm . Sie wies zwischen 0,3 und 0,6 μm ein Maximum auf. Die myelinisierten Nervenfasern verteilten sich ihrer Größe nach im MAN zwischen 1 und 7 μm . Das Maximum der Größenverteilung myelinisierter Nervenfasern lag zwischen 2 und 4 μm .

2. Größe und Funktion der Spinalganglienzellen

2.1 Größenverteilung der Spinalgangliensomata

Flächen: Die Durchmesser von 62 retrograd markierten und 198 nicht markierten Spinalgangliensomata zwischen L1 und S1 wurden gemessen und die Flächen errechnet. Die Verteilung reichte von weniger als $50 \mu\text{m}^2$ bis über $1350 \mu\text{m}^2$. Für markierte Zellen fand sich ein Maximum bei $450 \mu\text{m}^2$, für nicht-markierte Zellen bei $350 \mu\text{m}^2$. Für die Neuronen, die auf einen hypotonen Reiz mit einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{iz}}$ reagierten, ergab sich bezüglich der Größenverteilung ebenfalls ein Maximum bei $350 \mu\text{m}^2$. Über die Hälfte dieser Zellen besaßen Somata mit einer Fläche zwischen 300 und $600 \mu\text{m}^2$ (Abbildung 5).

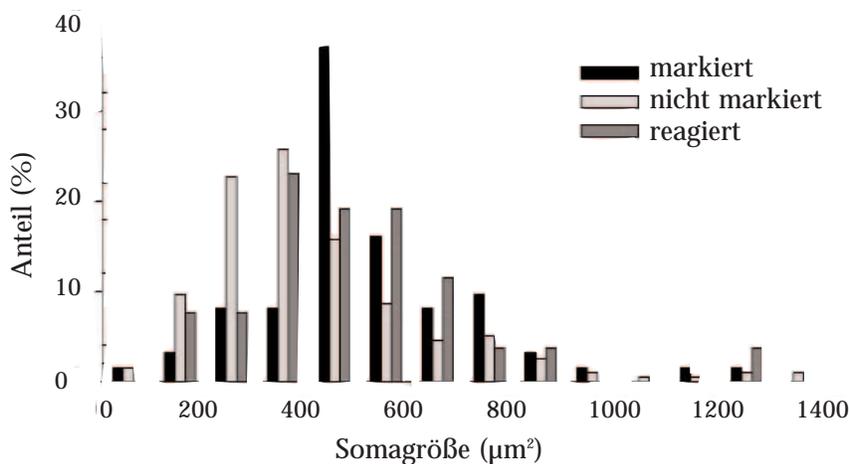


Abbildung 5. Größenverteilung der Spinalganglienzellkörper. Die retrograd markierten Neuronen (schwarze Säulen) weisen ein Maximum zwischen 400 und $500 \mu\text{m}^2$ auf. Das Maximum der nicht markierten Neuronen (hellgraue Säulen) liegt zwischen 300 und $400 \mu\text{m}^2$. Zellen, die auf hypotone Reizung mit einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{iz}}$ reagieren, (dunkelgraue Säulen) besitzen in über der Hälfte der Fälle Somata mit einer Fläche zwischen 300 und $600 \mu\text{m}^2$.

2.2 Reaktion auf hypotonen Stimulus

Nach Überprüfung der Kultur konnten 1 bis 10 intakte Zellen pro Deckgläschenstück für $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{iz}}$ -Messungen ausgewählt werden.

Reizprotokoll: Für die Dauer von 100 Sekunden wurden die Zellen zur Kontrolle mit isotoner Flüssigkeit (Tabelle 1) umspült. Anschliessend wurde die Perfusion auf hypotone Lösung (Tabelle 1) umgestellt. Nachdem die Zellen in isotoner Lösung wieder ihre ursprüngliche intrazelluläre Kalziumkonzentration annähernd erreicht hatten, wurde mit Capsaicin stimuliert. Die Zeitverläufe von 25 Zellen wurden derart registriert.

Anstiegssteilheit und Amplitude: Die Anstiegssteilheit der $[Ca^{2+}]_{iz}$ unterschied sich von Zelle zu Zelle und die Maxima der Amplituden lagen ebenfalls nicht auf der gleichen Höhe.

Markierte wie unmarkierte Zellen mit einer hohen Anstiegsgeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_{iz}$ erreichten größere Maximalwerte, also höhere Amplituden, der $[Ca^{2+}]_{iz}$ als Zellen mit einer niedrigen Anstiegsgeschwindigkeit. Dieser statistisch hochsignifikante ($p=0,005$) Zusammenhang ist in Abbildung 6 dargestellt.

Latenzen: Wie Abbildung 7 zu entnehmen ist, gab es Zellen, die etwa 25 Sekunden, und Zellen, die erst über 200 Sekunden nach Setzen des Stimulus mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$ reagierten. Sie zeigten bei hypotoner Stimulierung also unterschiedliche Latenzen bis zur Veränderung der $[Ca^{2+}]_{iz}$.

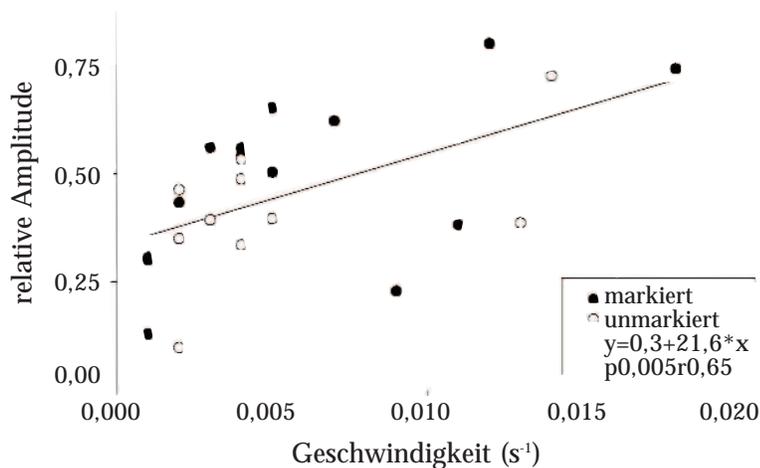


Abbildung 6 . Amplitude versus Anstiegssteilheit. Die Anstiegsgeschwindigkeit der Kalziumkonzentration (X-Achse) hängt signifikant mit der maximal erreichten Amplitudenhöhe (Y-Achse) zusammen. Je mehr Kanäle einer Zelle sich in dem offenen Zustand befinden, um so schneller könnten intrazelluläre Konzentrationen verändert werden und um so deutlichere Schwankungen finden möglicherweise statt.

Für die nichtmarkierten Zellen bot sich eine Aufteilung in schnell und langsam reagierende Neuronen an (je etwa 50 %). Als schnell antwortende Zellen galten diejenigen, welche innerhalb der ersten ca. 50 Sekunden reagierten, als langsam diejenigen, die ca. 250 Sekunden benötigten.

Während von 11 nichtmarkierten Zellen 6 innerhalb der ersten 50 Sekunden und die übrigen 5 nach 225 Sekunden einen Anstieg zeigten, verteilten sich die Zeiten bis zur Reizantwort bei 14 markierten gleichmäßiger zwischen 30 und 330 Sekunden. Bei den markierten Zellen konnte deshalb lediglich zwischen reagierenden (17 von 26) und nicht reagierenden (9 von 26) Kniegelenksafferenzen unterschieden werden.

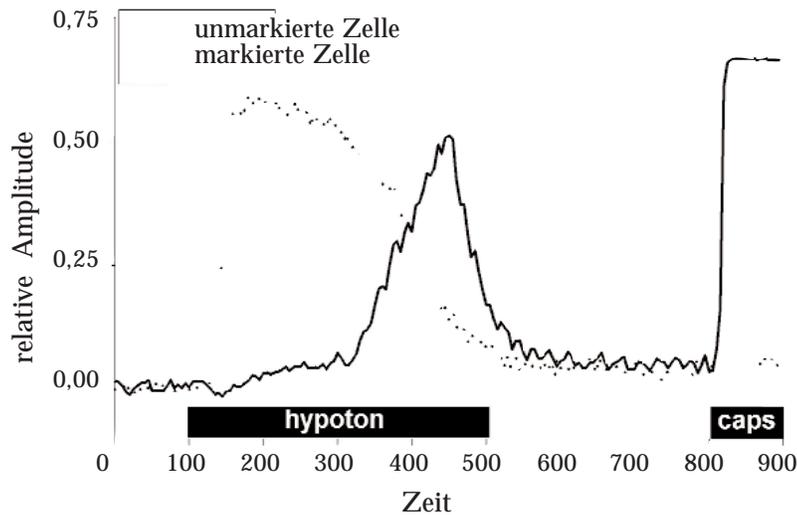


Abbildung 7. Zwei beispielhafte Zellen. Unterschiedliche Zeitverläufe der intrazellulären Kalziumkonzentration zweier Neuronen bei hypotoner Reizung (100-500 Sekunden) und bei Gabe von Capsaicin (ab 800 Sekunden). Beide Zellen reagieren auf hypotone Stimulierung, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten, mit unterschiedlicher Anstiegssteilheit und mit unterschiedlichen Maxima. Nur eine Zelle reagiert auf Capsaicin mit einem typischen steilen und sofortigen Anstieg.

Reaktionsbeginn und Somagröße: Als Anstiegsbeginn galt der Zeitpunkt, zu dem eine Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration um 10% der erreichten Amplitudenspitze registriert wurde. Sowohl kleine als auch große Neuronen reagierten mit unterschiedlichen Latenzen. Die Latenz der Reaktion korrelierte nicht mit der Somagröße (Abbildung 8). In der Abbildung 8 (sowie in Abbildungen 9, 10 und 11) sind die früh und die spät reagierenden Gruppen der unmarkierten Zellen zu erkennen, während die markierten Neuronen bezüglich des Reaktionszeitpunktes gleichmäßiger verteilt sind.

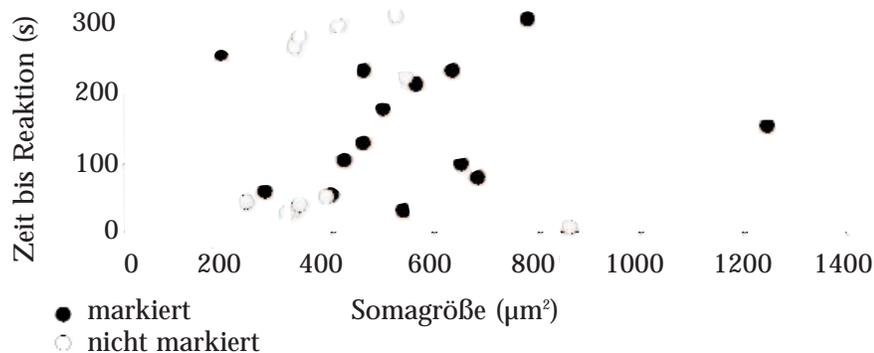


Abbildung 8. Reaktionsbeginn versus Somagröße. Die Zeit bis zum Reaktionsbeginn (Y-Achse) ist unabhängig von der Somagröße (X-Achse). Nichtmarkierte Zellen (leere Kreise) lassen sich anhand des Reaktionsbeginns in zwei Gruppen einteilen: Früh reagierende (< ca. 50 Sekunden) und spät reagierende (> ca. 250 Sekunden).

Reaktionsbeginn und Amplitude: Auch zwischen dem Reaktionsbeginn und der maximal erreichten intrazellulären Kalzium-Amplitude zeigte sich keine Korrelation. Wie Abbildung 9 zu entnehmen ist, erreichten sowohl früh als auch spät reagierende Neuronen unterschiedlich hohe Amplituden.

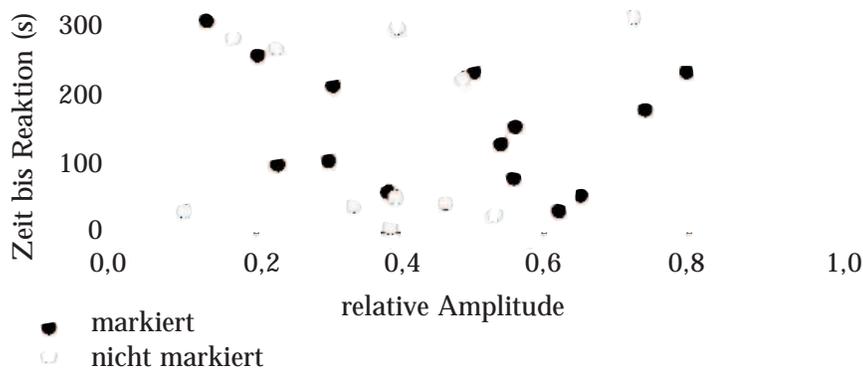


Abbildung 9. Reaktionsbeginn vs. Amplitudenhöhe. Die Zeit bis zum Reaktionsbeginn (Y-Achse) ist unabhängig von der relativen Amplitude (X-Achse). Nichtmarkierte Zellen (leere Kreise) lassen sich anhand des Reaktionsbeginns in zwei Gruppen einteilen: Früh reagierende (< ca. 50 Sekunden) und spät reagierende (> ca. 250 Sekunden). Markierte Zellen (ausgefüllte Kreise) verteilen sich gleichmäßig in diesem Zeitrahmen.

2.3 Reaktion auf Capsaicin

Capsaicin-Antwort: In Abbildung 7 findet sich auch der typische Verlauf einer Zellantwort bei Reizung mit Capsaicin. Auf einen abrupten steilen Anstieg der $[Ca^{2+}]_{iz}$ folgt ein hoch gelegenes Plateau. Mittels eines hypotonen Stimulus wurde zuvor das mechanische Antwortverhalten der Zellen definiert. Die sensiblen Zellen reagierten typischerweise ohne größere Verzögerung auf Capsaicin und erreichten schnell das stets hochgelegene Maximum ihrer Amplitude. Nach Beendigung des Reizes verblieb die $[Ca^{2+}]_{iz}$ für lange Zeit (bis zu 30 Minuten) auf hohem Niveau. Geringe Antworten auf Capsaicin waren möglicherweise auf veränderte Strömung der Lösung zurückzuführen und somit nicht capsaicinspezifisch.

Markierte und unmarkierte Zellen: 13 markierte und 11 unmarkierte mechanosensitive Zellen wurden zusätzlich zu dem hypotonen Reiz auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Capsaicin überprüft. Dabei zeigte sich, dass 3 der markierten Zellen und 9 der unmarkierten Zellen mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ auf eine Exposition gegenüber 0,5 μM Capsaicin reagierten. Insgesamt reagierte also die Hälfte (12/ 24) der getesteten Zellen. Die Verhältnisse bei markierten und unmarkierten Zellen waren jedoch umgekehrt. Während etwa

82 % bei den nichtmarkierten Neuronen reagierten, waren es bei den markierten 77 %, die keine Antwort auf den Capsaicinreiz zeigten. Von 8 markierten Zellen, die nicht auf den hypotonen Reiz reagierten, antwortete die Hälfte auf Capsaicin. Die Capsaicin-Empfindlichkeit stand in keinem Zusammenhang mit der Zeit bis zur Reaktion der Zelle auf den hypotonen Stimulus (Abb.10).

Fläche: Die unmarkierten mechano- und capsaicin-sensitiven Zellen waren im Trend kleiner ($< 450 \mu\text{m}^2$) als die nicht-reagierenden Zellen ($p = 0,1$) (Abb. 11). In der Gesamtgrößenverteilung befanden sich beide Gruppen im Maximum.

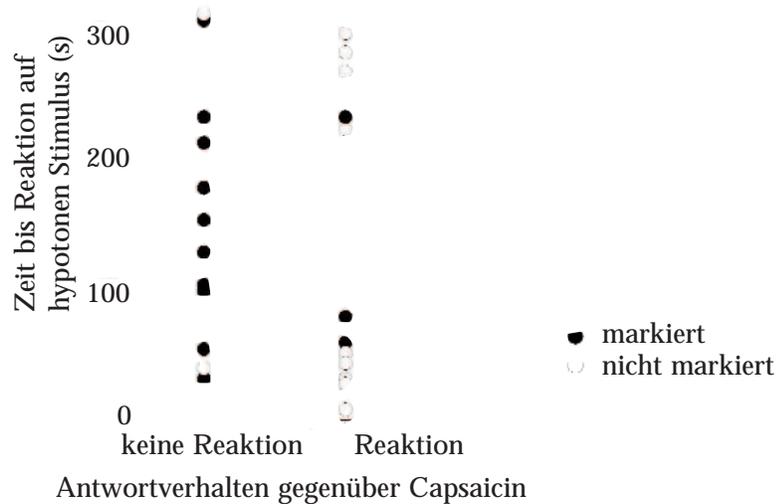


Abbildung 10. Antwortverhalten gegenüber Capsaicin. Das Antwortverhalten der Zellen gegenüber Capsaicin war unabhängig von der Zeit bis zur Reaktion auf den hypotonen Stimulus (Y-Achse). 9 von 11 unmarkierten Neuronen reagierten zusätzlich zu der Antwort auf den hypotonen Reiz auch auf Capsaicin. Nur 3 von 13 markierten Zellen reagierten auf Capsaicin.

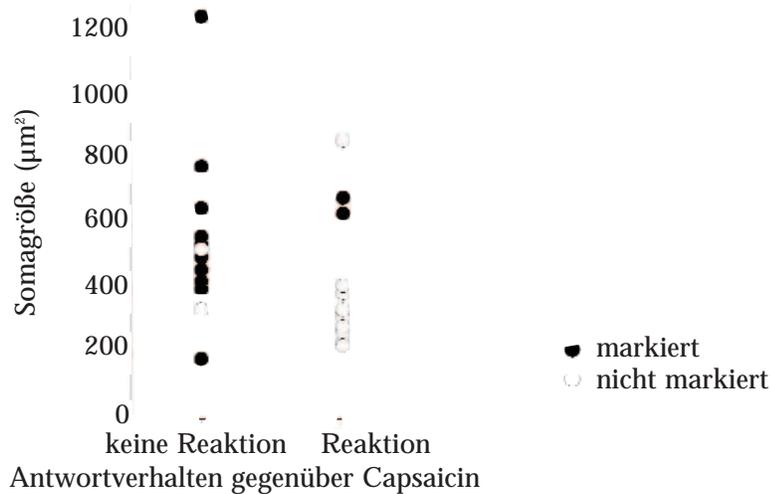


Abbildung 11. Antwortverhalten gegenüber Capsaicin. Die nichtmarkierten Zellen (weiß), die auf Capsaicin reagierten, waren im Trend eher klein. Die markierten Neuronen (schwarz) wiesen bei Mechanosensitivität selten zusätzliche Capsaicin-Sensitivität auf.

2.4 Membranpotential

Aktionspotentiale: Abbildung 12 zeigt als Folge der Depolarisation die Auslösbarkeit von Aktionspotentialen durch zuvor unterschwellige elektrische Reize. Im unteren Graphen ist das Reizprotokoll mit positivem und negativem Strompuls dargestellt. Im oberen Graphen ist das Membranpotential eines Neurons in isotonem und hypotonem Medium zu sehen.

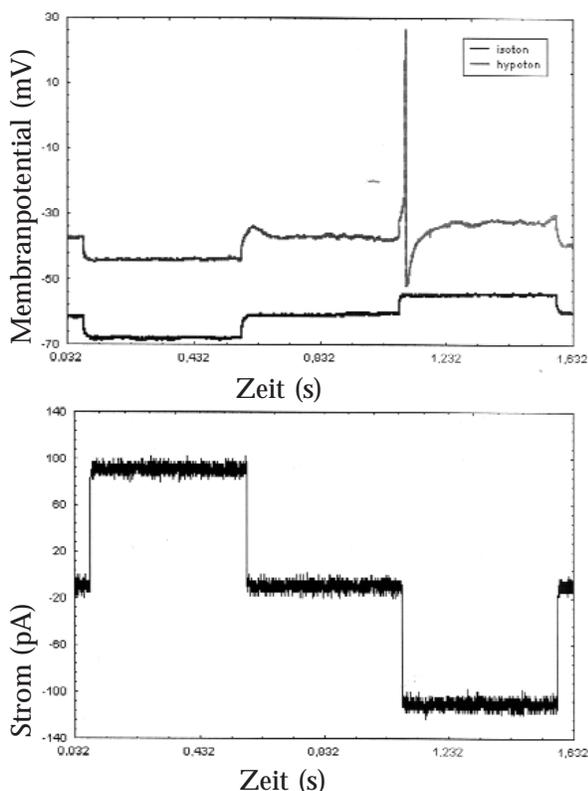


Abbildung 12. Membranpotential. Die Depolarisation während hypotoner Stimulierung führt zur Auslösbarkeit von Aktionspotentialen durch zuvor unterschwellige elektrische Reize.

Simultane Registrierung: Bei drei markierten Spinalganglienzellen wurden simultan Veränderungen des Membranpotentials und der intrazellulären Kalziumkonzentration gemessen. Die Aufnahmen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen wurden mit Patch-clamp-Ableitungen synchronisiert. Alle 5 Sekunden wurde die intrazellulären Kalziumkonzentrationen registriert und gleichzeitig das Membranpotential bei rechteckigen positiven und negativen Strompulsen gemessen.

Synchrone Reaktionen: Die Abbildung 13 zeigt, wie bei ansteigender $[Ca^{2+}]_{iz}$ („A“) das Membranpotential von ca. -70 mV auf ca. -40 mV zunimmt („B“). Die Leitfähigkeiten ($L = I / U$) („C“) veränderten sich zeitgleich mit der intrazellulären Kalziumkonzentration und dem Membranpotential.

Die Leitfähigkeit bei positivem Strompuls (durchgezogene Linie in „C“) nahm zunächst von etwa 8 nS rasch auf fast 20 nS zu, fiel auf ein niedrigeres Plateau für den Rest der Stimulationszeit und sank auf ca. 7 nS nach Beendigung des Reizes. Wie der Abbildung 13 zu entnehmen ist, verhielten sich in einem Neuron die $[Ca^{2+}]_i$, das Membranpotential und die Leitfähigkeit bei positivem Puls während der hypotonen Stimulierung bezüglich des Zeitverlaufs gleichsinnig. Die Leitfähigkeit bei negativem Strompuls bewegte sich weniger ausgeprägt in die entgegengesetzte Richtung.

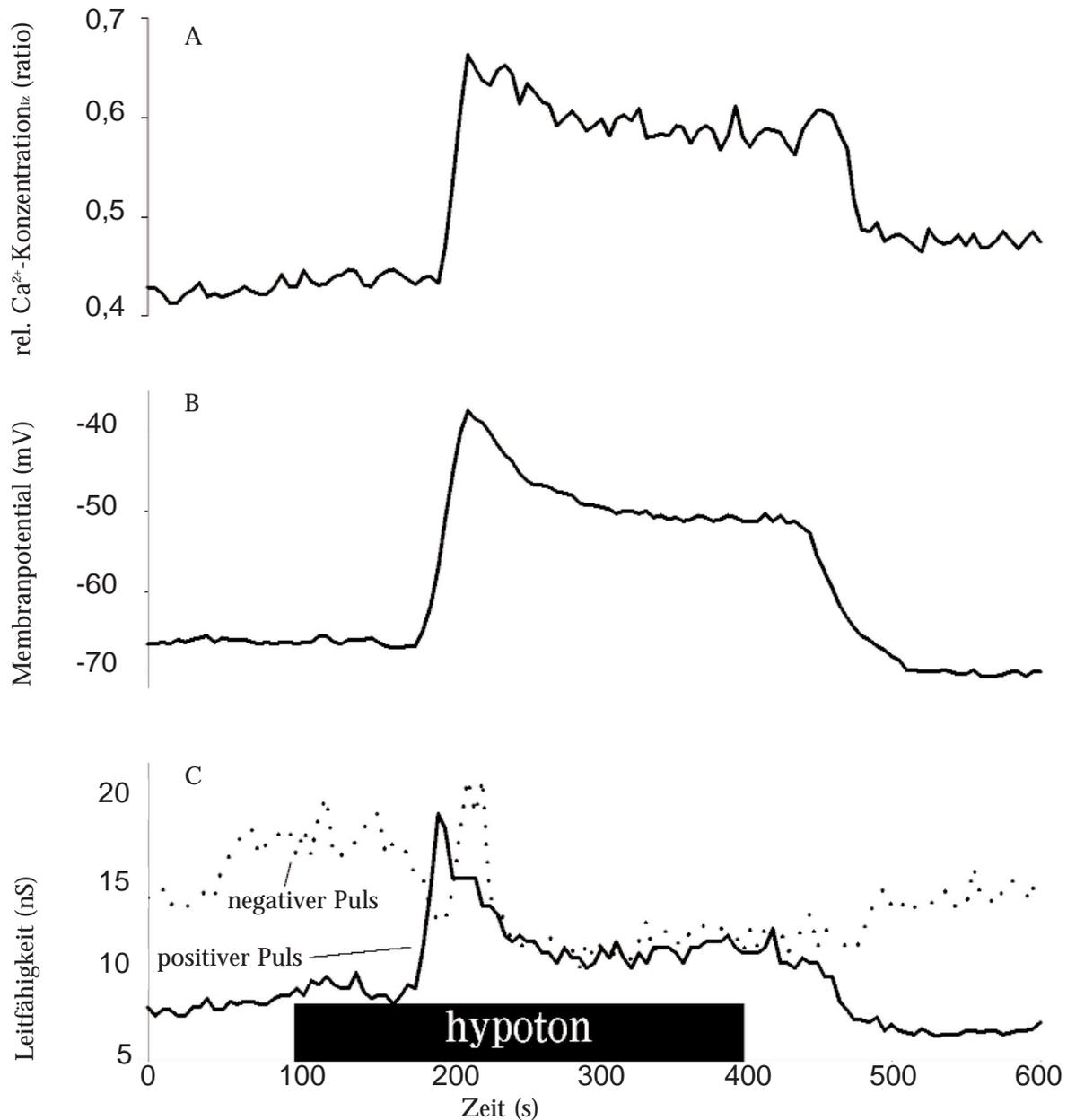


Abbildung 13. Patch-clamp und Ca^{2+} -Imaging. Simultane Messung der Schwankungen der relativen $[Ca^{2+}]_i$ (Graph A) des Membranpotentials (Graph B) und der bei positivem und negativem Puls gemessenen Leitfähigkeit (Graph C) zeigten synchrone Zeitverläufe aller drei Parameter während hypotoner Stimulierung. Es kam zur Depolarisation der Zellen, während die $[Ca^{2+}]_i$ anstieg.

Diskussion

Form und Funktion: Seit jeher ist die Neurophysiologie mehr oder weniger erfolgreich bemüht, einen Zusammenhang zwischen Morphologie und Funktionalität des Nervensystems aufzudecken. Das bei Springer erschienene Buch „Neuro- und Sinnesphysiologie“ von Prof. Dr. Robert F. Schmidt beginnt mit der Frage, welchen funktionellen Sinn man den Strukturen zuweisen kann, die wir durch das histologische Studium des Nervengewebes kennengelernt haben (Schmidt, 1998). So gelten dünn myelinisierte Nervenfasern als verantwortlich für die Weiterleitung von Signalen, die durch potentielle und tatsächliche Noxen ausgelöst wurden. Ferner ist bekannt, daß die kleinsten Somata häufig auch die Fortsätze mit den kleinsten Durchmessern aufweisen (Lawson und Waddell, 1991).

Kniegelenk: Für die Untersuchung von nozizeptiven Afferenzen hat sich das Knie als Modell etabliert, da Nozizeption die vorherrschende Sinnesmodalität dieses Gelenkes ist (Schaible und Grubb, 1993). Bisher liegen jedoch vorwiegend Kenntnisse über die innervierenden peripheren Nervenfasern des Kniegelenks vor, während die Ereignisse in den zugehörigen Zellkörpern weitgehend unklar geblieben sind. Was die Nervenfasern betrifft, so existieren besonders für Ratte und Katze detaillierte Vorstellungen über die herrschenden Verhältnisse, weniger ist über die sensible Versorgung des Knies der Maus bekannt. So besteht ein Teil der vorliegenden Arbeit aus morphologischen Untersuchungen der artikulären Nerven und ihrer Zellkörper.

Zellkörper: Um die Mechanismen der Transduktion zu untersuchen, sind die Nervenendigungen zu klein. Die experimentelle Zugänglichkeit der Somata von Kniegelenksafferenzen und die hohe Wahrscheinlichkeit, daß es sich bei diesen Neuronen um Nozizeptoren handelt, rechtfertigen das Vorgehen, die Zellkörper retrograd zu markieren, zu kultivieren und zu Versuchszwecken zu gebrauchen. Anschließend wurden die gewonnenen Erkenntnisse mit dem vorhandenen Wissen über periphere Kniegelenksafferenzen verglichen.

1. MAN und PAN der Maus im Vergleich zu anderen Spezien

Validität: Bei der Untersuchung der Kniegelenksinnervation an zwei Ratten konnten Daten erhoben werden, die mit der Studie von Hildebrand (1991) ver-

gleichbar sind. Daher kann davon ausgegangen werden, daß auch die hier vorgelegten Ergebnisse bezüglich der Kniegelenksinnervation der Mäuse valide sind. **Afferente und sympathische Axone:** Die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen des PAN und des MAN zeigen, daß 270 Nervenfasern das Kniegelenk der Maus innervieren. 70 % dieser Fasern sind unmyelinisiert. Zu diesen zählen afferente und sympathische Axone. In der Katze bestehen 55 % der unmyelinisierten Nervenfasern des PAN und des MAN aus sympathischen Efferenzen (Langford und Schmidt, 1983). Chirurgische oder auch chemische Sympathektomie an der Ratte zeigten eine Reduzierung der unmyelinisierten Fasern im PAN auf je 68 % und 31 %; dies führte zu der Aussage, daß zwei Drittel dieser Nervenfasern sympathisch sind (Hildebrand et al., 1991). Es ist wahrscheinlich, daß ähnliche Verhältnisse auch bei der Maus gelten. Geht man davon aus, daß 66 % der unmyelinisierten Nervenfasern zum sympathischen Nervensystem gehören, kommt man auf 127 sympathische Nervenfasern in beiden Rami articulares und 65 sensorische Axone.

Afferenzen: Da es sich bei myelinisierten Nerven der Gelenke stets um Afferenzen handelt (Hildebrand et al., 1991; Langford und Schmidt, 1983), innervieren 143 afferente Fasern das Kniegelenk der Maus über den PAN und den MAN.

Auszählungen retrograd mit Fluoro-Gold gefärbter Spinalganglienzellen wiesen bei zwei Monate alten Mäusen 238 ± 80 (Mittelwert \pm Standardabweichung) Afferenzen pro Kniegelenk auf; 189 ± 44 fanden sich in vier Monate alten Mäusen (Salo und Tatton, 1993). Die Mäuse der vorliegenden morphologischen Studie waren drei Monate alt und gehörten zu einem anderen Stamm. Die etwas größere Anzahl der Afferenzen dieser Untersuchung könnte aber auch auf kaum auszuschließendes Durchsickern des Farbstoffes bei der retrograden Markierung beruhen. Einige Nervenfasern könnten das Knie auch über Muskelnerven innervieren (Freeman und Wyke, 1967).

LAN: Ein signifikanter Beitrag des lateralen artikulären Nervs (LAN) scheint unwahrscheinlich, da er in der Katze nur unregelmäßig (Freeman und Wyke, 1967) und überhaupt nicht in der Ratte gefunden wurde (Hildebrand et al., 1991). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit nach diesem Nerven nicht gefahndet.

Unmyelinisierte Fasern: Die Größenverteilung der unmyelinisierten Nervenfasern im PAN und im MAN glich sich. Sie blieb in dem gleichen Rahmen, wies

das gleiche Maximum auf und ähnelte den Ergebnissen älterer Daten bezüglich der Katze, bei der sich eine Verteilung zwischen 0,1 und 1,5 μm mit einem Maximum bei 0,4/ 0,5 μm zeigte (Heppelmann et al., 1988). In Abbildung 14 zeigt sich diese Vergleichbarkeit der Größenverteilungen unmyelinisierter Nervenfasern im MAN von Maus und Katze.

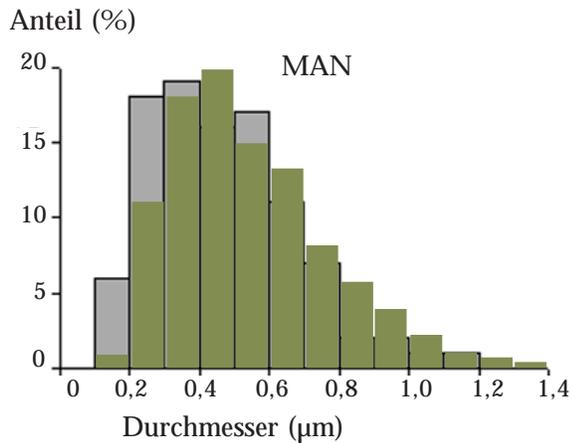


Abbildung 14. Unmyelinisierte Nervenfasern im MAN der Katze und der Maus. Die Größenverteilung der unmyelinisierten Nervenfasern der Katze (aus Heppelmann et al., 1988) ist hier in Farbe auf die Verteilung bei der Maus (vergleiche Abbildung 3) projiziert. Es zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung.

Myelinisierte Fasern: Auch die Größenverteilung der myelinisierten Nervenfasern des PAN und des MAN in der Maus wiesen Ähnlichkeiten auf. In beiden Nerven lag das Maximum zwischen 3 und 5 μm . Während im MAN gerade noch 1 % der Fasern einen Durchmesser zwischen 7 und 8 μm hatte, verteilten sich jedoch im PAN etwa 20 % der Fasern zwischen 7 und 13 μm . In diesem Bereich zeigten Nervenfaserdurchmesser im PAN der Katze ein zweites Maximum (1. Maximum bei 3 bis 4 μm , 2. Maximum bei 8 bis 9 μm) (Heppelmann et al., 1988). Im MAN der Katze fanden sich eine Verteilung zwischen 1 und 14 μm und ein Maximum bei 3 bis 4 μm .

Auch die Durchmesser im PAN der Ratte lagen, wie Abbildung 15 zu entneh-

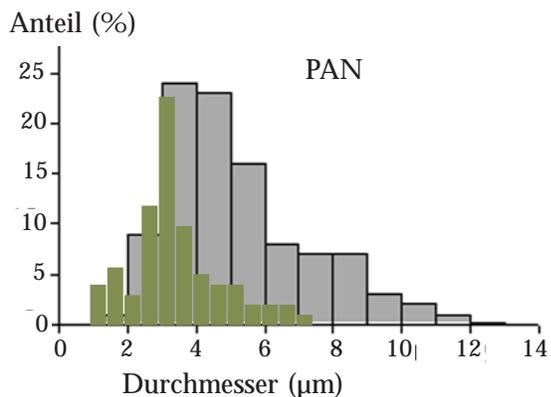


Abbildung 15. Myelinisierte Nervenfasern im PAN der Ratte und der Maus. Die Größenverteilung der myelinisierten Nervenfasern der Ratte (aus Hildebrand et al., 1991) ist in Farbe und 0,4 μm -Schritten auf die Verteilung bei der Maus (vergleiche Abbildung 4) projiziert. In beiden Diagrammen liegt das Maximum zwischen 3 und 4 μm .

men ist, zwischen 1 bis 8 μm mit einem Maximum bei 3 bis 4 μm (Hildebrand et al., 1991).

Speziesunabhängigkeit: Diese Daten geben Anlass zu der Vermutung, daß die Größenverteilung bei der Kniegelenksinnervation zumindest bei Ratte und Maus speziesunabhängig ist. Bei der Katze zeigte sich eine deutlicher bimodale Verteilung (Heppelmann et al., 1988), die aber ansonsten mit den Verhältnissen bei der Maus durchaus vergleichbar ist. Daß in der Ratte und besonders der Katze (etwa 1300 Nervenfasern; Langford und Schmidt, 1983) eine größere Anzahl an Kniegelenksafferenzen beschrieben wurde als bei der Maus, lässt sich vermutlich anhand des unterschiedlichen Ausmaßes an zu innervierender Fläche erklären. Bei der Katze ist das Kniegelenk größer und demzufolge werden mehr Nervenfasern für seine Versorgung benötigt als bei der kleineren Maus. Unter Berücksichtigung solcher Unterschiede könnte man formulieren, daß es sich bei dem neurologischen Bauplan für die Kniegelenksinnervation um eine speziesunabhängige Universalie zu handeln scheint.

2. Funktionelle Anatomie

2.1 Charakterisierung der Nervenfasern aufgrund ihrer Durchmesser

Boyd und Davey: Boyd und Davey teilten 1968 Nervenfasern nach ihrem Durchmesser in drei Gruppen ein. Zur Gruppe I (Aa) zählen Fasern mit einem Durchmesser über 12 μm . Fasern zwischen 6 und 12 μm gehören zur Gruppe II (Ab) und Fasern zwischen 1 und 6 μm zur Gruppe III (Ad). Demzufolge handelt es sich bei den myelinisierten Nervenfasern im PAN der Maus um Ad- und Ab-Fasern.

MAN und PAN: Gemeinsam betrachtet ergeben die quantitativen Daten mit der Klassifizierung von Boyd und Davey, daß die 33 Afferenzen des MAN sich aus 21 (64 %) Gruppe IV- (C), 11 (33 %) Gruppe III- und 1 (3 %) Gruppe II-Nervenfasern zusammensetzen. Für den PAN ergeben sich 109 Afferenzen à 43 (39 %) Gruppe IV-, 48 (44 %) Gruppe III- und 18 (17 %) Gruppe II-Fasern. Fasern der Gruppe I wurden nicht gefunden. Gruppe III und IV machen zusammen 97 % der Afferenzen im MAN aus. Diese Nervenfasern besitzen nicht-korpuskuläre sensorische Endigungen. Im PAN lassen sich nur 83 % der Fasern diesen Gruppen zuordnen. 17 % gehören zur Gruppe II, deren Fasern korpuskuläre Endigungen aufweisen.

Katze: In der Katze wurden vergleichbare Verteilungen gefunden (Heppelmann et al., 1998). 91 % der Nervenfasern im MAN der Katze gegenüber nur 74 % im PAN gehören zu den Gruppen III und IV.

Entsprechend der Durchmesserverteilung dient also auch bei der Maus die Innervation des Kniegelenks überwiegend der Nozizeption.

2.2 Charakterisierung der Spinalganglienzellen aufgrund ihrer Größe

Form und Funktion: Für Ratte und Katze wurden Zusammenhänge zwischen der Größe der Spinalganglienneuronen, der Durchmesser der zugehörigen Nervenfasern, ihrer Leitungsgeschwindigkeit und damit ihrer sensorischen Funktionalität gezeigt (Harper und Lawson, 1985; Fyffe, 1983; Yaksh und Hammond, 1982; Lee, 1986). Dabei stellte sich heraus, daß die am schnellsten leitenden Fasern zu den größten Somata und die langsamsten zu den kleinsten Somata gehören (Harper und Lawson, 1985). Diese Studien legen nahe, daß Spinalganglienneuronen mit einem großen Zellkörperdurchmesser propriozeptive und taktile Informationen übermitteln, während Neuronen mit kleinerem Durchmesser für Schmerz und Temperatur zuständig sind (Fyffe, 1983; Yaksh und Hammond 1982).

Vergleich: 1979 zeigte Lawson, daß die Somata der Spinalganglien der etwa einen Monat alten Maus eine Fläche zwischen 50 und 1400 μm^2 aufwiesen. Ein Maximum lag zwischen 200 und 400 μm^2 (vgl. Abbildung 16).

Die Subpopulation der mechanosensitiven Zellen neugeborener Ratten zeigte bezüglich der Nervenkörperdurchmesser ein Maximum zwischen 20 und 25 μm (314 bis 490 μm^2), während die absolute Mehrheit der Neuronen im Spinalganglion einen Durchmesser zwischen 15 und 20 μm (177 und 314 μm^2) hatten (Gotoh und Takahashi, 1999) (vgl. Abbildung 16).

Die meisten Nervenfasern des posterioren und des medialen artikulären Nervens der Maus wiesen einen Durchmesser von entweder $< 1 \mu\text{m}$ oder zwischen 1 und 6 μm auf und konnten damit den Gruppen IV (C) und III (Ad) zugerechnet werden. Das Maximum der Zellkörper der Kniegelenksafferenzen der Maus lag zwischen 400 und 500 μm^2 . An Ratten wurde gezeigt, daß Spinalganglienzellen dieser Größe eine Nervenleitungsgeschwindigkeit unter 2 m/s besaßen; sie wurden somit C- und Ad-Fasern zugeordnet (Lawson und Waddell, 1991) (vergleiche Abbildung 16).

Übereinstimmung: Das Maximum der Zellkörpergröße der Kniegelenksafferenzen der Maus entspricht also erwartungsgemäß in der Gruppenzugehörigkeit dem Maximum der Nervenfaserdurchmesser. Dies bestätigt die Ansicht, daß unmyelinisierte, langsam leitende Axone sehr kleinen Zellen entspringen, während myelinisierte, schnell leitende Fasern aus sehr großen Zellkörpern stammen; im mittleren Bereich ist Zellgröße eher ungeeignet, um Rückschlüsse auf Funktionalität zuzulassen (Lee et al., 1986). Auch anhand der Zellkörperflächen bestätigt sich also die vorwiegend nozizeptive Innervation des Kniegelenks der Maus.

Betrachtet man die Größenverteilung der reagierenden Zellen, so erkennt man ein Maximum zwischen 300 und 400 μm^2 und ein Plateau zwischen 400 und 600 μm^2 (Abbildung 16). Die größte mechanosensitive Zellgruppe bei neugeborenen Ratten hatte einen Durchmesser zwischen 20 - 25 μm (das entspricht einer Fläche von 314 - 491 μm^2) (Gotoh und Takahashi, 1999) (vergleiche Abbildung 16).

Die Fläche mechanosensitiver Zellen der Ratte stimmt also in etwa mit dem Maximum reagierender Neuronen in der vorliegenden Untersuchung überein. Histologische Eigenschaften wie die Fläche einer Zelle lassen demnach über die Grenzen verschiedener Spezien hinweg vorsichtige Rückschlüsse bezüglich der physiologischen Funktion zu.

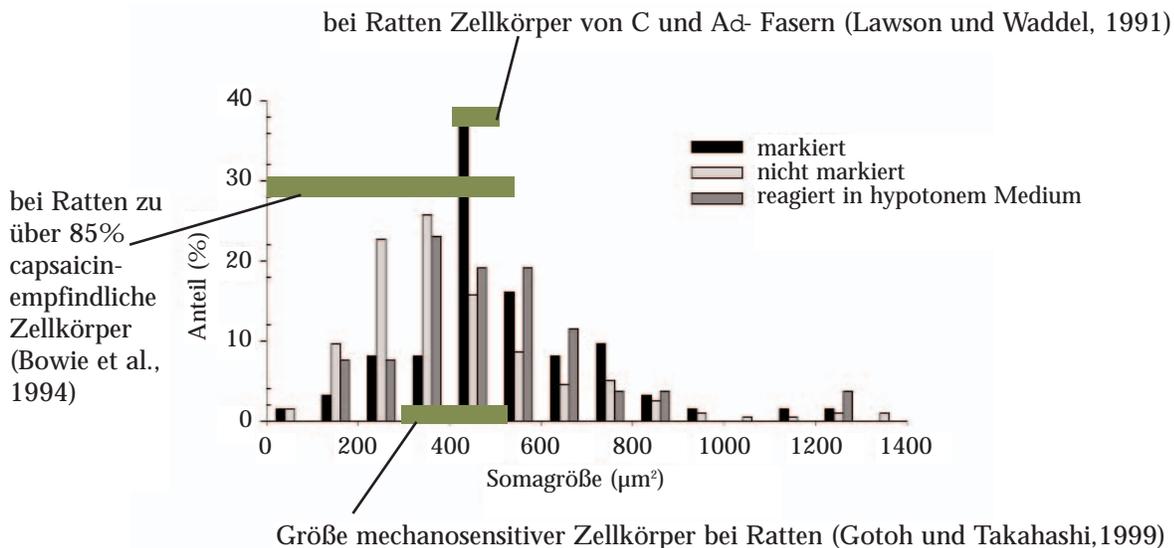


Abbildung 16. Somagröße bei Mäusen im Vergleich zu Ratten als Anhalt für Funktionalität. In der Größenverteilung der Spinalganglienzellen bei Mäusen (vergleiche Abbildung 5) fand sich das gleiche Maximum der mechanosensitiven Zellen wie bei Ratten. Das Maximum der markierten Zellen von Mäusen entspricht bei Ratten den Zellkörpergrößen, die mit C und A α -Fasern in Verbindung gebracht wurden. Auch bei Ratten waren eher kleine Neuronen capsaicinempfindlich.

Interpretationsgrenzen: Es kann zwar auf diese weiteren Gemeinsamkeiten zwischen den Spinalganglien von Mäusen und Ratten aufmerksam gemacht werden. Eine Klassifizierung der Zellen (etwa in A- oder C-Zellen) ist aber aufgrund der weiten Größenstreuung (300 bis 600 μm^2) nicht direkt möglich.

Daß das Maximum der markierten Zellen gegenüber den nichtmarkierten Zellen um 100 μm^2 zu den größeren Flächen hin verschoben lag, hat eventuell methodische Gründe. Um die Färbung als solche zu werten, wurde ein Vielfaches der Grundfluoreszenz der unter dem Mikroskop betrachteten Neuronen gefordert. Größere Zellen akkumulierten möglicherweise mehr Farbstoff und lieferten so eindeutigere Ergebnisse als kleinere Zellen. Letztere wurden dann möglicherweise falsch-negativ eingestuft. Dies könnte die Verschiebung zu größeren Flächen der markierten Neuronen erklären.

Speziesabhängigkeit: Die Größenverteilung der Spinalgangliensomata unterschieden sich im Gegensatz zu der Größenverteilung der Nervenfasern beträchtlich von Spezies zu Spezies. Während sie sich zwischen Ratten (Segond von Banchet et al., 1996; Suto und Gotoh, 1999) und Mäusen annähernd gleichen, lag das Maximum der Größenverteilung bei Katzen zwischen 950 und 1250 μm^2 (Lee, 1986). In einer Studie an adulten Ratten galten Spinalganglienzellen als mittelgroß bei einem Durchmesser zwischen 855 und 1075 μm^2 (Scroggs et al., 1994).

Eine erdenkliche Erklärung könnte sich auf die Tatsache stützen, daß größere Tiere längere Axone für die periphere Innervation benötigen als kleinere Tiere. Dies geht mit einer vermehrten Syntheseleistung einher. Womöglich müssen die Zellkörper als Folge dieses erhöhten Syntheseanspruchs größer sein.

3. Physiologie

Spinalganglien: Neben den morphologischen Untersuchungen peripherer Kniegelenksafferenzen der Maus wurden funktionelle Versuche an der Schnittstelle zum zentralen Nervensystem, den Spinalganglien, durchgeführt. Die Effekte hypoosmolarer Zellschwellung auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in kultivierten Spinalganglienzellen wurden untersucht. Die Kniegelenksafferenzen wurden zuvor retrograd markiert.

Kritik: Gelangt Farbstoff in einen Nerven, ist nicht auszuschließen, daß das Neuron dadurch in einem oder mehreren Aspekten auch funktionell verändert

wird. Zusätzlich befanden sich die Zellen außerhalb ihres natürlichen Mileus in einer Kultur. Vermutlich durch die unvermeidliche Schädigung des Neurons bei dessen Kultivierung wird die Rezeptorausstattung der Zelle mit der Zeit regulativ verändert (Segond von Banchet et al., 1996). Schließlich sind die eigentlich interessierenden Strukturen und deren Mechanismen in den Nervenendigungen und nicht im untersuchten Zellsoma lokalisiert. Diese Punkte sollten bei der Bewertung aller Aussagen bezüglich der Zellfunktion kritisch berücksichtigt werden.

3.1 $[Ca^{2+}]_{iz}$ -Erhöhungen bei hypotoner Stimulierung

DAK: Für die Transduktion mechanischer Kräfte über periphere Endigungen primär sensorischer Neuronen bei Säugetieren werden dehnungs-aktivierte Kanäle (DAK) verantwortlich gemacht (French, 1992; Drummond et al., 1998). Viele DAK sind kalziumdurchlässig (Yang und Sachs, 1990). Mechanische Stimulierung der Somata von Barorezeptoren mittels einer lokalisierten Strömung rief eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ hervor und führte somit zu der Vermutung, daß DAK sich auch in diesen Neuronen befinden und durch mechanische Deformierung der Zellmembran aktiviert werden (Sharma et al., 1995).

Osmotische Stimulierung: Veränderungen des Zellvolumens, die durch Applikation hypo- und hyperosmolarer Lösungen bewirkt wurden, riefen Erhöhungen der $[Ca^{2+}]_{iz}$ sowohl bei osmorezeptiven Neuronen (Oliet und Bourque, 1993) als auch bei aortalen Barorezeptorzellen (Cunningham et al., 1995) und bei verschiedenen nicht-neuronalen Zelltypen hervor (Chen et al., 1996; Kim und Fu, 1993; Harada et al., 1994). Kultivierte sympathische Neuronen hingegen zeigten keine Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration bei hypotoner Stimulierung (Leaney et al., 1997).

Gemeinsam weisen diese Arbeiten darauf hin, daß ein enger Zusammenhang zwischen den Antworten auf hypotone Reize und Neuronen, in denen Prozesse der Mechanotransduktion stattfinden, besteht. Die vorliegenden Ergebnisse bestärken auch die Annahme, daß moderat hypotone Lösungen als adäquate Reize einsetzbar sind, um primär sensorische Neuronen mit Mechano-sensitivität selektiv zu rekrutieren.

Trigeminalganglienzellen: $[Ca^{2+}]_{iz}$ -Erhöhungen fanden nur in einem Teil von hypoton umspülten Trigeminalganglien-Zellen (TG-Zellen) statt, benötigten

Ca²⁺-Einwärtsstrom und wurden erheblich durch Gadolinium, einem Antagonisten an vielen DAK, reduziert (Hamill und Mc Bride, 1996). Obwohl in Versuchen ohne extrazelluläres Kalzium und mit Antagonisten der Kalzium-Pumpen im endoplasmatischen Retikulum (Verwendung fanden Cyclopiazon-Säure und Thapsigargin) gezeigt wurde, daß in TG-Zellen der Eintritt extrazellulären Kalziums den wesentlichen Teil der [Ca²⁺]_{iz}-Antworten auf hypotone Reize ausmacht, sind Zeitverlauf und Charakteristiken dieser Antworten mit einer möglichen Beteiligung Kalzium-induzierter Kalzium-Freisetzung (KIKF) vereinbar (Viana et al., 2001).

KIKF: Ein derartiger Mechanismus wurde in einer Subpopulation von Spinalganglienneuronen von Ratten identifiziert (Shimgol et al., 1995; Usachev und Thayer, 1999). In Myokardzellen führte dieser Mechanismus dazu, daß über Membrandehnung provozierte initialer Kalzium-Einstrom häufig Wellen von KIKF nach sich zog (Sigurdson et al., 1992).

So scheinen auch die Erhöhungen der [Ca²⁺]_{iz} in den Spinalganglienzellen der Maus infolge hypotoner Reizung auf der Beteiligung von DAK zu beruhen, womöglich gefolgt durch die Öffnung von Kalzium-Kanälen.

3.2 Heterogenität kultivierter mechanosensitiver Neuronen

Bei mechanosensitiven Neuronen wurde zwischen niederschwelligen und hochschwelligen (=nozizeptiven) Neuronen unterschieden (Burgess und Perl, 1973). Zellen, die zusätzlich auf exogene Irritationen, endogene Chemikalien und extreme Temperaturen reagieren, wurden als polymodal nozizeptiv bezeichnet.

Trigeminalganglienzellen: Viana et al. (2001) teilten TG-Zellen neugeborener Mäuse in drei Gruppen auf. Bei hypoosmolarer Reizung unterschieden sie Zellen, deren Maximum an [Ca²⁺]_{iz} früh (21%) oder spät (57%) erreicht wurde. Eine dritte Gruppe repräsentierte die Zellen, die nicht mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration reagierten (22%). Es wurde vermutet, daß früh reagierende Zellen einen niedrigen und spät reagierende einen hohen mechanischen Schwellenwert besaßen.

Spinalganglienzellen: Betrachtet man lediglich die nicht-markierten Zellen, läßt sich diese Aufteilung auch auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie übertragen. Es gab Zellen, die früh (<50 Sekunden) und solche, die spät (>250 Sekunden nach Beginn der hypotonen Reizung) reagierten. 50% (23 von 46)

der nicht-markierten Zellen wiesen keine Veränderung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ auf. Zu berücksichtigen ist aber, daß Viana et al. (2001) nicht den Reaktionsbeginn, sondern den Zeitpunkt des $[Ca^{2+}]_{iz}$ -Gipfels für die Unterscheidung in früh ($34 \pm 3s$) und spät ($172 \pm 9s$) reagierende Zellen als Kriterium heranzogen. Man kann daraus folgern, daß Spinalganglienzellen tendenziell später reagieren.

Die durch Markierung als Kniegelenksafferenzen gekennzeichneten Neuronen scheinen einer heterogeneren Gruppe der Mechanorezeptoren anzugehören. Sie fügten sich nicht in dieses Schema. Ihre Reaktionszeiten lagen zwar im gleichen Zeitraum (30 bis 330 Sekunden). Die Verteilung innerhalb dieses Bereichs ließ aber keine separaten Scharen erkennen. Von 26 markierten Zellen reagierten 17 (65%). 9 Zellen (35%) wiesen keine Veränderung der $[Ca^{2+}]_{iz}$ auf.

Funktionelle Besonderheiten: Dieser Unterschied zwischen Trigeminalganglien-Zellen und Kniegelenksafferenzen deutet möglicherweise auf funktionelle Besonderheiten der neuronalen Subpopulationen hin. Trigeminalganglien beherbergen wie die nicht-markierten Spinalganglien beispielsweise überwiegend Hautafferenzen und Neuronen, die tiefer liegendes Gewebe sensibel innervieren. Derartige Gemeinsamkeiten könnten erklären, wieso sich in den hypoosmolaren Experimenten für beide Ganglienarten schnell und langsam reagierende Zellgruppen zeigten.

Die Neuronen, deren Nervenendigungen in der Kniegelenkscapsel mit dem Farbstoff in Kontakt kamen, sind keine Hautafferenzen und innervieren eben lediglich das von der Capsel eingeschlossene Gewebe. Sie reagierten zeitlich gegenüber hypotoner Stimulierung anders. Im Einklang zu dieser Beobachtung stehen auch Untersuchungen, die unterschiedliche chemische Aspekte für primär afferente Neuronen der Haut, der Muskulatur und der Gelenke konstatierten. O'Brien und seine Kollegen zeigten beispielsweise an Ratten, daß Thiamin-Monophosphat und Somatostatin in hautinnervierenden Nervenzellen eine viel größere Rolle spielen als bei der neuralen Versorgung von Gelenken, wo hauptsächlich Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) und Substanz P gefunden wurden (O'Brien et al., 1989) .

In den vorliegenden Versuchen an Kniegelenksafferenzen fanden sich also keine Gruppen, die mit den bei Trigeminalganglienzellen beschriebenen vergleichbar gewesen wären. Vielmehr reagierten die Zellen zu beliebigen Zeitpunkten. Dies entspricht dem Befund von Just et al. (2000), daß im Kniegelenk der Ratte keine eindeutige Trennung zwischen niedrigschwelligen (Propriozeptoren) und

hochschwelligem (Nozizeptoren) sensorischen Einheiten möglich ist. Auch Schaible und Schmidt hatten schon 1983 an der Katze eine große Variationsbreite der Reizschwellen der Kniegelenksafferenzen aufgezeigt.

Anstiegssteilheit und Amplitude: Die Geschwindigkeit, mit der die $[Ca^{2+}]_{iz}$ einer reagierenden Zelle anstieg, (Anstiegssteilheit) korrelierte bei markierten wie nicht-markierten Neuronen mit der Höhe der maximalen Amplitude. Zellen mit einem schnellen Anstieg erreichten höhere Amplituden als Zellen mit einem flachen Anstieg. Dies deutet darauf hin, daß bei den Zellen mit hoher Amplitude mehr Kanäle in den offenen Zustand versetzt wurden. So konnte die intrazelluläre Konzentration schneller verändert werden und insgesamt mehr Kalzium in die Zelle eindringen.

Fläche: Wie Abbildung 9 zu entnehmen ist, zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Zeit bis zum Reaktionsbeginn und der erreichten Amplitudenhöhe oder der Somagröße. Viana und seine Kollegen zogen aus ihren Untersuchungen den Schluss, dass Somagröße kein geeigneter Parameter für die Reaktionsfreudigkeit von trigeminalen Neuronen war (Viana et al., 2001). Dies gilt wohl auch für Spinalganglienzellen.

3.3 Capsaicin-Sensitivität

Reaktionscharakteristika: Capsaicin ist eine recht spezifische Substanz für die Erregung polymodaler Nozizeptoren (Szolcsanyi et al., 1988). Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration bei Reizung mit Capsaicin bestehen aus zwei Komponenten: Ein schneller Anstieg wird von einem lang anhaltenden Plateau gefolgt. Für neugeborene Ratten wurde gezeigt, daß der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bei Reizung mit Capsaicin von extrazellulärem Kalzium abhängt, nicht durch die Abwesenheit von extrazellulärem Natrium beeinflusst wird, die Plateauphase aber durch intrazelluläre Kalziumspeicher aufrechterhalten wird (Bowie et al., 1993). Viana et al. (2001) zeigten an Mäusen für 58 % (n=100) der getesteten Trigeminalganglien-Zellen Capsaicin-Sensitivität. Für Ratten bestätigten Schmidt et al. (2000) diesen Anteil mittels Ableitungen an Kniegelenksafferenzen.

Spinalganglienzellen: Auch für Spinalganglienzellen von Mäusen ergab sich in der vorliegenden Arbeit ein ähnlicher Prozentsatz (50%). Besonders bei den nicht-markierten, capsaicinsensitiven Zellen zeigte sich im Trend ($p = 0,1$) eine

eher kleine Somatagröße. Korreliert man kleine Somata mit dünnen Axonen, so stimmt hier die Gruppenzugehörigkeit (C-Fasern = Gruppe IV) mit der Capsaicin-Sensitivität erwartungsgemäß überein. Dieser Zusammenhang zwischen Somagröße und Capsaicin-Empfindlichkeit fand sich auch bei neugeborenen Ratten; kleine ($<17 \mu\text{m}$ Durchmesser) und mittelgroße (17 bis $25 \mu\text{m}$) Spinalganglienzellen reagierten zu über 85 % auf Capsaicin, während große Zellen ($>25 \mu\text{m}$) nur ausnahmsweise einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zeigten (Bowie et al., 1993).

Daß markierte Zellen auch bei diesem Experiment häufig größer waren als nicht-markierte, könnte wieder an den in einem vorangehenden Abschnitt (Charakterisierung der Spinalganglienzellen) erläuterten methodischen Gegebenheiten gelegen haben.

Kniegelenksafferenzen: Die markierten Neuronen, die nicht auf hypotone Stimulierung reagierten, zeigten einen Prozentsatz an capsaicin-sensitiven Zellen, der mit 50 % deutlich höher lag als bei den mechanosensitiven Knieafferenzen. Ebenfalls waren 50 % der nichtmarkierten Zellen, die einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in hypoosmolarer Lösung aufwiesen, capsaicinempfindlich. Von 17 unmarkierten Spinalganglienneuronen, die nicht mechanosensibel waren, reagierte keine auf Capsaicin.

Überraschenderweise zeigten die markierten mechanosensitiven Neuronen (also diejenigen, welche Afferenzen aus der Kniegelenkskapsel repräsentieren und auf hypotone Reize ansprechen) ebenfalls in nur etwa 2 % einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration auf Capsaicin. Dieser Widerspruch zu Arbeiten, die von einem größeren Anteil an capsaicin-empfindlichen Nerven im Kniegelenk ausgehen, könnte mit der geringen Stichprobengröße, aber auch mit einer Eigenart dieser Zellen zusammenhängen. Beispielsweise ist die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß diese Zellen einer rein mechanosensiblen Subpopulation von Nozizeptoren angehören, die nicht polymodal sind und deren Nervenendigungen intrakapsulär liegen. Nicht alle Nozizeptoren sind polymodal (= capsaicinempfindlich) (Schmidt et al., 1995). In den Versuchen an Kniegelenksafferenzen, bei denen weit über 50 % der Zellen capsaicin-sensitiv waren (Schmidt et al., 2000), trugen möglicherweise auch Neuronen mit extrakapsulär gelegenen Rezeptoren zu den Ergebnissen bei.

Polymodalität: Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration infolge hypotoner Reizung wurden sowohl bei Capsaicin-sensitiven als auch bei -insen-

sitiven Neuronen beobachtet. Dieser Befund stimmt mit der Beschreibung von Mechanosensitivität bei einigen Nozizeptortypen überein, die als polymodal klassifiziert wurden (Bessou und Perl, 1969; Lynn und Carpenter, 1982).

Neuronen der vorliegenden Untersuchung, die auf Capsaicin mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration reagierten, zählten sowohl zu der Subpopulation der früh, als auch der spät auf hypoosmolare Reizung antwortenden Zellen. Die frühe Reaktion wurde von Viana et al. (2001) als Zeichen eines niedrigen mechanischen Schwellenwertes gedeutet. Da in der vorliegenden Arbeit mitunter früh reagierende Neuronen auch capsaicin-empfindlich (hochschwellig/nozizeptiv) waren, scheint eine Übertragung dieser Interpretation auf die Spinalganglienzellen suspekt.

Kniegelenksinnervation: Während also die Mehrheit der nicht markierten getesteten Spinalganglienzellen (9 von 11 Neuronen) capsaicin-sensitive Nozizeptoren waren, zeigten die meisten Kniegelenksafferenzen (10 von 13 Neuronen) keine Anzeichen von Polymodalität.

Die Innervation des Kniegelenks der Maus scheint somit auf mechanische Noxen spezialisiert zu sein.

3.4 Membranpotential

Spannungsabhängige Kalzium-Kanäle: Um ein detaillierteres Bild von den Mechanismen der $[Ca^{2+}]_{iz}$ -Erhöhung auf hypotonen Reiz zu erhalten, wurden die Kalzium-Messungen mit Ganzzell-patch-clamp-Untersuchungen kombiniert. An Trigeminalganglien-Zellen wurde gezeigt, daß ein nM Nickel (ein unspezifischer Blocker spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle) die $[Ca^{2+}]_{iz}$ -Erhöhung reduzierte (Viana et al., 2001). Auch für die Spinalganglienzellen könnte die Öffnung spannungsabhängiger Kanäle an schwellungsinduzierten $[Ca^{2+}]_{iz}$ -Antworten beteiligt sein. Dies ist mit der Beobachtung vereinbar, daß Nifedipin (ein L-Typ Kalzium-Kanal-Blocker) bei GH3-Zellen aus der Hypophyse die $[Ca^{2+}]_{iz}$ -Erhöhung bei hypoosmolarer Stimulierung verhindert (Chen et al., 1996).

Andererseits wird mechanisch induzierter Kalzium-Einwärtsstrom in den Barorezeptoren der Aorta über Gadolinium-sensitive Kanäle und nicht etwa über spannungsabhängige Kalzium-Kanäle vermittelt (Sullivan et al., 1997).

Darüberhinaus wurden Chlorid-Ströme beschrieben, die in verschiedenen Zelltypen durch Schwellung aktiviert wurden (Nilius et al., 1996). Neuronale

Zellen wiesen diese Ströme ebenfalls auf (Leaney et al., 1997). Sie tragen möglicherweise zu einer Depolarisation bei.

Depolarisation: Bei den drei elektrophysiologisch untersuchten Zellen zeigte sich als Pendant zum Kalzium-Signal eine Depolarisation des Membranpotentials. Während die $[Ca^{2+}]_{iz}$ bei hypotoner Stimulierung anstieg, depolarisierte die Zelle. Diese Depolarisation führte dazu, daß zuvor unterschwellige elektrische Reize Aktionspotentiale auslösen konnten (Abbildung 12). Ähnliches konnten auch Viana et al. (2001) an Neuronen der Trigeminalganglien zeigen. Koerber et al. (1988) zeigten an Spinalganglienzellen der Katze, daß schmale Aktionspotentiale mit Mechanosensitivität assoziiert waren. Die Leitfähigkeiten bei positiven und negativen Strompulsen verliefen nicht gleichsinnig. Ihr Verhältnis war nicht linear. Bei positivem Strompuls stieg die Leitfähigkeit an.

Chlorid-Kanäle: So scheint es sich bei den für die Depolarisation hauptverantwortlichen Kanälen entweder um einwärtsgerichtete Anionen- (z. B. für Chlorid) oder um auswärtsgerichtete Kationen-Kanäle (z. B. für Kalium) zu handeln. Die oben dargestellten Zusammenhänge führen zu der Vermutung, daß es sich um Chlorid-Kanäle handelt. Dies und die Entdeckung eines mechanosensitiven Chlorid-Kanals in Wachstumshügeln von Spinalganglienneuronen der Ratte (Imai et al., 2000) weisen auf die Beteiligung von Anionen bei der Mechanotransduktion hin.

Ausblick

Die Aufklärung der Mechanotransduktion könnte ein gezieltes therapeutisches Eingreifen in die Entstehung arthritischer und anderer mechanisch induzierter Schmerzen ermöglichen. Es gibt derzeit Bemühungen, artikuläre, nozizeptive Nervenendigungen mittels Hyaluronsäure vor mechanischer Reizung zu schützen. Hierzu fanden sowohl Ableitungen an peripheren Kniegelenksafferenzen der Katze und der Ratte (Pawlak et al., 2000) als auch Untersuchungen an Oozyten von *Xenopus laevis* (de la Peña und Sala, 2000) und an kultivierten primär sensorischen Neuronen der Maus (de la Peña und Schmidt, 2000) statt. Durch die vorliegende Arbeit stehen nun Daten zu der peripheren Innervation sowie zu Charakteristiken der kultivierten Kniegelenksneuronen der Maus zur Verfügung. So können jetzt beide Strategien - die Untersuchungen an den Nervenfasern wie an den Zellkörpern - weiterverfolgt werden und dabei von Erkenntnissen dieser Arbeit profitieren.

Zusammenfassung

Das Kniegelenk ist aufgrund seiner besonderen Innervation ein geeignetes Modell zur Erforschung der Nozizeption. Diese Innervation wurde an sechs Mäusen elektronenmikroskopisch untersucht, um die Analyse funktioneller Versuche auf ein anatomisches Grundwissen stützen zu können.

Es zeigte sich, daß der mediale artikuläre Nerv (MAN) 75 ± 28 Nervenfasern enthielt, 63 ± 24 unmyelinisierte und 12 ± 6 myelinisierte.

Der posteriore artikuläre Nerv (PAN) bestand aus 195 ± 50 Nervenfasern, 129 ± 28 unmyelinisierte und 66 ± 24 myelinisierte.

Die Durchmesser der myelinisierten Nervenfasern im MAN reichten von 1 bis 8 μm mit einem Maximum zwischen 2 und 5 μm .

Im PAN wiesen sie eine Größenverteilung zwischen 1 und 12 μm mit einem Maximum bei 4 bis 5 μm und einem Plateau bei 8 bis 9 μm auf.

Diese Daten sprechen für eine weitgehende histologische Vergleichbarkeit der Kniegelenksafferenzen der Maus mit anderen Spezien. An Katze und Ratte wurden sowohl entsprechende Nervenfasertypen als auch ähnliche Zusammensetzungen der beiden Nerven gezeigt. Lediglich die Anzahl der primären

Afferenzen ist bei der im Verhältnis kleineren Maus geringer. Die Funktionalität wurde an den Somata der retrograd markierten Kniegelenksafferenzen in den Spinalganglien von zehn Mäusen untersucht. Hier sind die für Mechano-transduktion verantwortlichen Strukturen zugänglicher als an den winzigen Nervenendigungen.

Auch die Somata wurden zunächst durch Flächenbestimmung anatomisch charakterisiert. Funktionell wurden neben anderen primär sensorischen Neuronen aus den Spinalganglien zum ersten Mal Zellkörper der Kniegelenksafferenzen auf Mechano-transduktion hin untersucht. Durch hypoosmolare Lösung wurden die kultivierten Somata gedehnt. Schwankungen der intrazellulären Kalzium-Konzentrationen und elektrophysiologische Veränderungen wurden dabei registriert.

Die primär sensorischen Neuronen, die nicht an der Kniegelenksinnervation beteiligt waren, zeigten ähnliche Reaktionen wie sie in anderen Arbeiten bei Trigeminalganglienzellen der Maus beschrieben worden waren. Es fanden sich eine schnell, eine langsam und eine nicht reagierende Subpopulation.

Die Somata der Kniegelenksafferenzen hingegen ließen sich diesen Gruppen nicht zuteilen, sondern reagierten zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Dies legt die Vermutung nahe, daß im Knie keine einfache Trennung zwischen Afferenzen mit niedrigem mechanischen Schwellenwert (für Propriozeption) und hohem mechanischen Schwellenwert (für Nozizeption) möglich ist. Die überwiegend mechanosensitive Subpopulation der Neuronen, die das Kniegelenk innervieren, unterscheidet sich funktionell von anderen Spinalganglienzellen.

Die Testung mit Capsaicin zeigte, daß es sich bei den mechanosensitiven Kniegelenksafferenzen selten um polymodale Nozizeptoren handelte. Nicht-mechanosensitive Kniegelenksafferenzen und andere Spinalganglienzellen zeigten häufiger Capsaicin-Sensitivität. Sowohl die Größenverteilung der Nervenfasern als auch die ihrer Zellkörper sind überwiegend mit nozizeptiven Eigenschaften vereinbar.

Zusammen betrachtet läßt dies vermuten, daß das sensorische Hauptcharakteristikum des Kniegelenks der Maus die Empfindlichkeit gegenüber mechanischen Noxen ist.

Literatur

Altamirano J., Brodwick M. S., Alvarez-Leefmans F. J. (1998) Regulatory volume decrease and intracellular Ca^{2+} in murine neuroblastoma cells studied with fluorescent probes. *J. Gen. Physiol.*, 112, 145-160.

Benndorf K., Koopmann R., Eismann E., Kaupp U. B. (1999) Gating by cyclic GMP and voltage in the alpha subunit of the cyclic GMP-gated channel from rod photoreceptors. *J. Gen. Physiol.*, 114, 477-490.

Bessou P., Perl E. R. (1969) Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibres to noxious stimuli. *J. Neurophysiol.*, 32, 1025-1043.

Bowie D., Feltz P., Schlichter R. (1993) Subpopulations of neonatal rat sensory neurons express functional neurotransmitter receptors with elevated intracellular calcium. *Neuroscience*, 58, 141-149.

Boyd I. A., Davey M. R. (1968) Composition of peripheral nerves, *E. and S. Livingstone*, Edinburgh.

Burgess G. M., Mullaney I., McNeil M., Dunn P. M. and Rang H. P. (1989) Second messengers involved in the mechanisms of action of bradykinin in sensory neurons in culture. *J. Neurosci.* 9, 3314-3325.

Burgess P. R., Perl E. R. (1973) Cutaneous mechanoreceptors and nociceptors. In: *Handbook of Sensory Physiology. Somatosensory System.* ed. Iggo A., Springer, New York, 29-78.

Chen Y., Simasko S. M., Niggel J., Sigurdson W. J., Sachs F. (1996) Ca^{2+} uptake in GH3 cells during hypotonic swelling: the sensory role of stretch-activated ion channels. *Am. J. Physiol.*, 270, C1790-C1798.

Cunningham J. T., Wachtel R. E., Abboud F. M. (1995) Mechanosensitive currents in putative aortic baroreceptor neurons in vitro. *J. Neurophysiol.*, 73, 2094-2098.

Drummond H. A., Price M. P., Welsh M. J., Abboud F. M. (1998) A molecular component of the arterial baroreceptor mechanotransducer. *Neuron*, 21, 1435-1441.

Freeman M. A. R., Wyke B. (1967) The innervation of the knee joint: An anatomical and histological study in the cat. *J. Anat.*, 101, 505-532.

French A. S. (1992) Mechanotransduction. *Annu. Rev. Physiol.*, 54, 135-152.

Fyffe R. E. W. (1983) Afferent fibers. In *Handbook of the Spinal Cord* (ed. Davidoff R. A.), Vols 2 and 3, pp. 79-136, Marcel Decker, New York.

Garcia-Añoveros J., Corey D. P. (1997) The molecules of mechanosensation. *Annu. rev. Neurosci.*, 20, 567-594.

Gardener E (1944), The distribution and termination of nerves in the knee joint of the cat. *J. Anat.*, 80, 11-32.

Gilbertson T. A., Damak S., Margolskee R. F. (2000), The molecular physiology of taste transduction. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 10, 519-527.

Gotoh H., Takahashi A. (1999) Mechanical stimuli induce intracellular calcium response in a subpopulation of cultured rat sensory neurons. *Neuroscience*, 92 , 1323-1329.

Gotoh H., Takahashi A. (2000) Mechanosensitive whole-cell currents in cultured rat somatosensory neurons. *Brain Res.*, 869, 225-230.

Hamill O. P., McBride D. W. Jr. (1996) The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol. Rev.*, 48, 231- 252.

Hanesch U., Heppelmann B. (1995) A simple method for a specific retrograde labelling of dorsal root and sympathetic ganglion cells innervating the knee joint of the cat. *Journal of Neuroscience Methods*, 63, 55-59.

Harada N., Ernst A., Zenner H. P. (1994) Intracellular calcium changes by hyposmotic activation of cochlear outer hair cells in the guinea pig. *Acta Otolaryngol.*, 114, 510-515.

Harper A. A., Lawson S. N. (1985) Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Physiol., Lond.* 493, 371-384.

Heppelmann B., Heuss C., Schmidt R. F. (1988) Fibre size distribution of myelinated and unmyelinated axons in the medial and posterior articular nerves of the cat's knee joint. *Somatosensory Research*, 5, 273-281.

Hildebrand C., Öquist G., Brax L., Tuisku F. (1991) Anatomy of the rat knee joint and fibre composition of a major articular nerve. *Anat. Rec.*, 229, 545-555.

Imai K., Tatsumi H., Katayama Y. (2000) Mechanosensitive chloride channels on the growth cones of cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, 97, 347-355.

Just S., Pawlak M., Heppelmann B. (2000) Responses of fine primary afferent nerve fibres innervating the rat knee joint to defined torque. *J. Neuroscience Methods*, 103, 157-162.

Kano M., Kawakami T., Hikawa N., Hori H., Takenaka T., Gotoh H. (1994) Bradykinin- responsive cells of dorsal root ganglia in culture; cell size, firing, cytosolic calcium, and substance P. *Cell. molec. Neurobiol.*, 14, 49-57.

Karnes J., Robb R., O'Brien P. C. Lambert E. H., Dyck P. J. (1977) Computerized image recognition for morphometry of nerve attribute of shape of sampled transverse sections of myelinated fibres which best estimates their average diameter. *J. Neurol. Sci.*, 34, 43-51.

- Khoa N. D., Hasunuma T., Kobata T., Kato T., Nishioka K. (1999) Expression of murine HOXD9 during embryonic joint patterning and in human T lymphotropic virus type I tax transgenic mice with arthropathy resembling rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 42, 686-696.
- Kim D., Fu C. (1993) Activation of a nonselective cation channel by swelling in atrial cells. *J. Membr. Biol.*, 135, 27-37.
- Koerber H. R., Druzinsky R. E., Mendell L. M. (1988) Properties of somata of spinal dorsal root ganglion cells differ according to peripheral receptor innervated. *J. Neurophysiol.*, 60, 1584-1596.
- Langford L. A., Coggeshall R. E. (1980) The use of potassium ferricyanide in neural fixation. *Anat. Rec.*, 197, 297-303.
- Langford L. A., Schmidt R. F. (1983) Afferent and efferent axons in the medial and posterior articular nerves of the cat. *Anat. Rec.*, 206, 71-78.
- Lawson S. N. (1979) The postnatal development of large light and small dark neurons in mouse dorsal root ganglia: a statistical analysis of cell numbers and size. *J. Neurocytol.*, 8, 275-294.
- Lawson S. N., Waddell P. J. (1991) Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *J. Physiol.*, 435, 41-63.
- Leaney J. L., Marsh S. J., Brown D. A. (1997) A swelling activated chloride current in rat sympathetic neurones. *J. Physiol.*, 501, 555-564.
- Lee K. H., Chung K., Chung J. M., Coggeshall R. (1986) Correlation of cell body size, axon size, and signal conduction velocity for individually labelled dorsal root ganglion cells in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 243, 335-346.
- Lynn B., Carpenter S. E. (1982) Primary afferent units from the hairy skin of the rat hind limb. *Brain Res.*, 238, 29-43.

McCarter G. C., Reichling D. B., Levine J. D. (1999) mechanical transduction by rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *Neurosci. Lett.* 273, 179-182.

McGuirk S. M., Vallis Y., Pasternak C. A., Dolphin A. C. (1989) Bradykinin enhances excitability in cultured rat sensory neurons by a GTP-dependent mechanism. *Neurosci. Lett.* 99, 85-89.

McGuirk S. M., Dolphin A. C. (1992) G-protein mediation in nociceptive signal transduction: an investigation into the excitatory action of bradykinin in a subpopulation of cultured rat sensory neurons. *Neuroscience*, 49, 117-128.

Nilius B., Eggermont J., Voets T., Droogmans G. (1996) Volume activated Cl⁻ channels. *General Pharmacology*, 27, 1131-1140.

O'Brien C., Woolf C. J., Fitzgerald M., Lindsay R. M., Molander C. (1989) Differences in the chemical expression of rat primary afferent neurons which innervate skin, muscle or joint. *Neuroscience*, 32 (2), 493-502.

Oike M., Droogmans G., Nilius B. (1994) Mechanosensitive Ca²⁺ transients in endothelial cells from human umbilical vein. *PANS*, 91, 2940-2944.

Oliet S. H., Bourque C. W. (1993) Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature*, 364, 341-343.

Pawlak M., Belmonte C., Schmidt R. F. (2000) Mechanoprotective actions of elastoviscous hylans on articular pain receptors. Hyaluronan 2000 at The North East Wales Institute, Wrexham, Wales, UK.

de la Peña E., Sala S., Schmidt R. F., Belmonte C. (2000) Responses of native stretch-activated ion channels on adult xenopus laevis oocytes to hylan solutions. Hyaluronan 2000 at The North East Wales Institute, Wrexham, Wales, UK.

de la Peña E., Schmidt R. F., Belmonte C., Viana F. (2000) Cultured mouse primary sensory neurons as a model to study the hyaluron effects on mechanosensory responses. Hyaluronan 2000 at The North East Wales Institute, Wrexham, Wales, UK.

Rintala M., Metsaranta M., Saamanen A. M., Vuorio E., Ronning O. (1997) Abnormal craniofacial growth and early mandibular osteoarthritis in mice harbouring a mutant type II collagen transgene. *J. Anat.*, 190, 201-208.

Rosloniec E. F., Brand D. D., Meyers L. K., Whittington K. B., Gumanovskaya M., Zaller D. M., Woods A., Altmann D. M., Stuart J. M., Kang A. H. (1997) An HLA-DR1 transgene confers susceptibility to collagen-induced arthritis elicited with human type II collagen. *J. Exp. Med.*, 185, 1113-1122.

Salo P. T., Tatton W. G. (1993) Age-related loss of knee joint afferents in mice. *J. Neurosci. Res.*, 35, 664-677.

Schaible H., Grubb B. (1993) Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain*, 55, 5-54.

Schaible H., Schmidt R. F. (1983) Activation of groups III and IV sensory units in medial articular nerve by local mechanical stimulation of knee joint. *J. Neurophysiol.*, 49, 35-44.

Schmidt R. F. (1998) Neuro- und Sinnesphysiologie, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York*, 3. Auflage.

Schmidt R. F., Pawlak M., Heppelmann B., Hanesch U. (2000) Functional characteristics of primary afferents innervating normal and inflamed knee joints of the rat. *Eur. J. Physiol.*, Supplement to Vol. 439, No. 6.

Schmidt R. F., Schmelz M., Forster C., Ringkamp M., Torebjork E., Handwerker H. (1995) Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J. Neurosci.*, 15, 333-341.

Scroggs R. S., Todorovic S. M., Anderson E. G., Fox A. P. (1994) Variation in I_H , I_{IR} and I_{LEAK} between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J. Neurophysiol.*, 71, 271-279.

Segond von Banchet G., Petersen M., Heppelmann B. (1996) Bradykinin receptors in cultured rat dorsal root ganglion cells: Influence of length of time in culture. *Neuroscience*, 75 (4), 1211-1218.

Sharma R. V., Chapleau M. W., Hajduczuk G., Waachtel R. E., Waite L. J., Bhalla R. C., Abboud F. M. (1995) Mechanical stimulation increases intracellular calcium concentration in nodose sensory neurons. *Neuroscience*, 66, 433-441.

Shingol A., Verkhatsky A., Isenberg G. (1995) Calcium-induced calcium release in rat sensory neurons. *J. Physiol.*, 489, 627-636.

Sigurdson W. Ruknudin A., Sachs F. (1992) Calcium imaging of mechanically induced influxes in tissue-cultured chick heart: role of stretch-activated ion channels. *Am. J. Physiol.*, 262, H1110-H1115.

Skoglund S (1956) Anatomical and physiological studies of knee joint innervation of the cat. *Acta. Physiol. Scand.*, 36 (Suppl. 124), 3-101.

Sullivan M. J., Sharma R. V., Waachtel R. E., Chapleau M. W., Waite L. J., Bhalla R. C., Abboud F. M. (1997) Non-voltage-gated Ca^{2+} influx through mechanosensitive ion channels in aortic baroreceptor neurons. *Circ. Res.*, 180, 861-867.

Suto K., Gotoh H. (1999) Calcium signaling in cold cells studied in cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, 92 (3), 1131-1135.

Szolcsanyi J., Anton F., Reeh P., Handwerker H. O. (1988) Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin. *Brain Res.*, 446, 262-268.

Usachev Y. M., Thayer S. A. (1999) Ca^{2+} influx in resting rat sensory neurons that regulates and is regulated by ryanodine-sensitive Ca^{2+} stores. *J. Physiol.*, 519, 115-130.

Viana F., de la Peña E., Pecson B., Schmidt R. F., Belmonte C. (2001) Swelling-activated calcium signalling in cultured mouse primary sensory neurons. *Eur. J. of Neuroscience*, 13, 722-734.

Vogl A., Noe J., Breer H., Boekhoff I. (2000) Cross-talk between olfactory second messenger pathways. *Eur. J. Biochem.*, 267, 4529-4535.

Walker R. G., Willingham A. T., Zuker C. S. (2000) A drosophila mechanosensory transduction channel. *Science*, 287, 2229-2234.

Yaksh T. L., Hammond D. L. (1982) Peripheral and central substrates involved in the rostral transmission of nociceptive information. *Pain*, 13, 1-85.

Yang X. C., Sachs F. (1990) Characterization of stretch-activated ion channels in xenopus oocytes. *J. Physiol.*, 431, 103-122.

Danksagungen

Bei folgenden Personen aus dem *Physiologischen Institut der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg* möchte ich mich (in alphabetischer Reihenfolge) herzlich bedanken:

- für wertvolle Kritik der morphologischen Untersuchungen bei
Professor Bernd Heppelmann,
- für wertvolle Kritik der funktionellen Untersuchungen bei
Doktor Stefan Just,
- für wertvolle methodische Ratschläge bei
Professorin Marlen Petersen,
- für das Zustandekommen dieser Arbeit bei meinem Doktorvater
Professor Robert F. Schmidt,
- für technische Assistenz bei den morphologischen Untersuchungen bei
Brigitte Trost.

Folgenden Personen aus dem *Institut der Neurowissenschaften der Universität Miguel Hernández in Alicante* (Spanien) gilt ebenfalls mein Dank:

- Professor Carlos Belmonte
für die Gastfreundschaft in seinem Institut,
- Doktor Elvira de la Peña
für wertvolle Kritik der funktionellen Untersuchungen,
- Eva Quintero
für technische Assistenz bei den morphologischen Untersuchungen,
- Rosa Velasco
für technische Assistenz bei den Zellkulturen,
- Professor Félix Viana
für wertvolle Kritik der funktionellen Untersuchungen.

Die Arbeit wurde großzügigerweise finanziell durch
die *Max von Frey-Gesellschaft e. V.* unterstützt.

Curriculum Vitae

Name: Martin Ebinger
Adresse: Fliegenstraße 1, 80337 München
E-mail: martin.ebinger@gmx.de
Telefon: + 49 - 179 322 6797
Geburtsdatum: 28. Dezember 1974
Geburtsort: Bonn
Familienstand: Ledig
Nationalität: Deutsch
Eltern: Dr. Heinz Ebinger, Radiologe und Nuklearmediziner
Monika Ebinger, geborene Göhler, Diplom-Dolmetscherin

Studium: 1995 - -Medizinstudent,
2001 Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg
1997 - -Philosophiestudent,
2001 Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg
2001 -Medizinstudent im Praktischen Jahr: Wahlfach Neurologie,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Qualifikation: 1994 -Abitur, Collegium Josephinum Bonn,
staatlich genehmigtes Gymnasium in der Trägerschaft des
Provinzialates der Redemptoristen e. V. Köln
1997 -Ärztliche Vorprüfung,
Julius-Maximilians Universität Würzburg
1998 -Zwischenprüfung Philosophie,
Julius-Maximilians Universität Würzburg,
-1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,
Julius-Maximilians Universität Würzburg,
-United States Medical Licensing Examination, Step One,
Frankfurt
2000 -2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,
Julius-Maximilians Universität Würzburg
2001 -3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Famulaturen: 1997 -Chirurgie, Victoria Hospital, Mahé, Seychellen (ein Monat)
1998 -Psychiatrie, Allg. Krankenhaus Eilbek, Hamburg (ein Monat)
1999 -Pädiatrische Praxis, Dr. Mayer, Würzburg (ein Monat)
2000 -Notfallmedizin, Northwest Community Hospital,
Chicago, USA (ein Monat)

Praktika:	1994	-Krankenhaus Bouar, Zentralafrikanische Republik, ZAR (zwei Monate)
		-Krankenhaus Bossangoa, ZAR (ein Monat)
		-Forschungszentrum Donaval, Bangui, ZAR (ein Monat)
	1995	-St. Elisabeth-Krankenhaus Köln (zwei Monate)
		-St. Elisabeth-Krankenhaus Bonn (zwei Monate)
	1996	-Astronautenzentrum, European Space Agency (ESA), Köln (ein Monat)
Erfahrungen:	1991/2	-Austauschschüler, Lawrence High School, Kansas, USA (sechs Monate)
	1992/3	-Schülersprecher am Collegium Josephinum Bonn (ein Jahr)
	1998/9	-Forschungsaufenthalt am Institut für Neurowissenschaften, Universität Miguel Hernández, San Juan de Alicante, E (vier Monate), unterstützt von der Max von Frey-Gesellschaft e. V., -Assistent im Praktikum der Physiologie, Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg (zwei Semester)
	2002	-Assistent bei Harrison Clinical Research, München (seit Jan.)
Sprachen:		-Deutsch (Muttersprache), -Englisch (fließend), -Französisch (gute Sprachkenntnisse), -Spanisch (Grundkenntnisse), -Großes Latinum
Promotion:	1998	-Medizinische Doktorarbeit:
	2002	Histologie und Funktion der Kniegelenksinnervation der Maus. Eine Studie über Anzahl und Größenverteilung der Nervenfasern sowie über Mechanotransduktion der primär sensorischen Spinalganglienzellen. bei Prof. R. F. Schmidt am Physiologischen Institut, Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg
	2002	-Philosophisches Promotionsvorhaben: Die Neurophänomenologie: Ein Oxymoron als Lückenfüller. Die Transformation der Phänomenologie durch Francisco J. Varela - eine Deformation? bei Prof. K.-H. Lembeck am Philosophischen Institut, Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg
