

Aus dem Institut für Physiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. Andreas Karschin

Immunhistochemische Darstellung vom spannungsabhängigen Calciumkanälen an peripheren
afferenten Nervenfasern im Kniegelenk der Maus

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinische Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Carsten Leipold-Büttner
aus Würzburg

Würzburg, September 2005

Referent: Priv.-Doz. Dr. Bernd Heppelmann
Koreferent: Prof. Dr. H. Koepsell
Dekan: Pof. Dr. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2006

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	
2.1 Präparation des Gewebes	4
2.2 Darstellung der Calciumkanäle	4
2.2.1 Immunhistochemischer Nachweis der Calciumkanal-Untereinheiten	4
2.2.2 Darstellung des kombinierten Nachweises von Verapamil-bzw. Conotoxin-Bindungsstellen an CGRP-positiven Nervenfasern	5
2.3 Auswertung	6
2.4 Protokolle	
2.4.1 Protokoll zum immunhistochemischen Nachweis von Calcium-Kanal-Untereinheiten	7
2.4.2 Protokoll des kombinierten Nachweises von Verapamil- bzw. Conotoxin-Bindungsstellen an CGRP-immunpositiven Nervenfasern	9
3. Ergebnisse	
3.1 Verteilung des L-Typ Calciumkanals	11
3.2 Verteilung des N-Typ Calciumkanals	15
4. Diskussion	18
5. Zusammenfassung	22
6. Literaturverzeichnis	23

1. Einleitung:

In der klinischen Praxis spielen Erkrankungen an den Gelenken, besonders an dem Kniegelenk eine immer größere Rolle. Dies liegt an den großen unphysiologischen Belastungen, denen das Kniegelenk durch bestimmte Sportarten ausgesetzt ist, aber auch an normalen Abnutzungserscheinungen bei älteren Patienten. Diese Erkrankungen führen zu starken Schmerzen, die häufig einen chronischen Verlauf haben und somit die Lebensqualität der Patienten auf Dauer einschränken.

Mit Hilfe von Tiermodellen, die in ihrem klinischen Erscheinungsbild menschlichen Erkrankungen ähneln, können Schmerz und Nozizeption gut untersucht werden. Das Kniegelenk der Katze und der Ratte wurde bei elektrophysiologischen Untersuchungen von Gelenkafferenzen in normalem und entzündeten Gewebe das Modell der Wahl (z.B. Heppelmann et al. 1986, Just et al. 2000).

Die afferenten nozizeptiven Fasern der Gruppe III und IV bestehen aus dünnen markhaltigen oder marklosen Nervenfasern und kommen in fast allen Geweben von Säugetieren vor. Da der überwiegende Teil der afferenten Innervation des Kniegelenkes aus diesen Fasern (Heppelmann et al. 1988; Ebinger et al. 2001) besteht, kann man davon ausgehen, dass die Hauptsensation des Kniegelenkes Schmerz ist (Schaible und Grubb 1993). Aus diesem Grund ist das Kniegelenk sehr interessant für die Untersuchung nozizeptiver Afferenzen.

Neuropeptide spielen bei nozizeptiven Vorgängen eine wichtige Rolle. Im Bereich der Reizaufnahme, das heißt im entzündeten Gewebe, führt die Freisetzung von Neuropeptiden, wie Substanz P und Calcitonin Gene related Peptide (CGRP), aus den peripheren Nervenendigungen am Ort der noxischen Reizung zu einem Ödem, einer Hyperämie und einem Erythem. Da diese Entzündungszeichen von der Funktion und Integrität peripherer sensorischer Neurone abhängen, wurde diese Reaktion neurogene Entzündung genannt (Herbert, Holzer 2002). Beispielsweise wird bei Menschen mit chronischer Arthritis erhöhte CGRP- Spiegel in der Synovialflüssigkeit (Larsson et al. 1989), sowie ein verminderter CGRP-Gehalt der freien Nervenendigungen in der Synovia gefunden (Gronblad et al. 1988, Mapp et al. 1990).

Auch bei der zentralnervösen Verarbeitung nozizeptiver Information spielen Neuropeptide eine Rolle (Yusaf et al. 2001). Das Neuropeptid Substanz P zum Beispiel wird in vielen spinalen Neuronen des Rückenmarks und supraspinalen Kernen des Gehirns produziert und ist dort

an der Verarbeitung von Schmerz beteiligt (Harlan et al. 1989, Zimmer et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass gentechnisch veränderte Mäuse, welche das Neuropeptid Substanz P nicht mehr produzieren konnten, keine signifikante Reaktion auf Schmerz mehr zeigten (Zimmer et al. 1998).

Neuropeptide, wie zum Beispiel CGRP, werden in großen elektronendichten Vesikeln gespeichert (Nasu et al. 1999; Harper et al. 2001). Man vermutet, dass spannungsabhängige Calciumkanäle eine wichtige Rolle bei der Freisetzung dieser Neuropeptiden aus den afferenten Nervenfasern spielen (Mansvelder and Kits 2000).

Bekannt ist, dass spannungsabhängige Calciumkanäle bei der Nozizeption im zentralen Nervensystem eine wichtige Rolle spielen (Bertolino and Llinas, 1992). In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass durch Blockade dieser Kanäle auf spinaler Ebene das subjektive Empfinden auf mechanische oder thermische Schmerzreize ein gesteigertes Schmerzempfinden, sowie vermehrte Berührungsempfindlichkeit an der entzündeten Stelle reduziert werden konnte (Vanegas and Schaible 2000).

Eine hohe Dichte verschiedener Calciumkanäle konnten auch im zentralen Nervensystem, besonders im Hippocampus, gefunden werden. Sie befinden sich an den Zellkörpern, den Dendriten und den axonalen Nevenendigungen, wo sie auf der präsynaptischen Seite eine wichtige Rolle in der Transmitterfreisetzung spielen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die inhibitorische Wirkung GABAerger Neurone viel wirkungsvoller durch hohe Konzentrationen von Calciumkanalblockern gehemmt werden konnte als durch die erregende Wirkung des natürlichen Gegenspielers Glutamat (Potier et al. 1993).

Man kann somit davon ausgehen, dass die Freisetzung von Neuropeptiden im zentralen Nervensystem über spannungsabhängige Calciumkanäle erfolgt. Primäre Afferenzen geben Neuropeptide aber auch in das periphere Gewebe ab, wo sie für verschiedene Entzündungssymptome, wie Ödembildung und Hyperämie verantwortlich sind.

Man kann vermuten, dass diese Freisetzung in einer ähnlichen Weise erfolgt, das heißt, dass spannungsabhängige Calcium-Kanäle eine wichtige Rolle spielen.

Ziel der Arbeit war es nun, diese spannungsabhängigen Calciumkanäle immunhistochemisch in der Kniegelenkscapsel nachzuweisen. Da afferente Nervenfasern der Gruppe III und IV zum großen Teil das Neuropeptid CGRP enthalten, sollte der immunhistochemische Nachweis durch Doppelmarkierungen sowohl des Neuropeptids als auch der Calciumkanäle erfolgen. Zunächst erfolgte die Darstellung von CGRP-haltigen Nervenfasern durch Inkubation des Gewebes mit fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen das Neuropeptid. Gleichzeitig erfolgte der Nachweis von spannungsabhängigen Calciumkanälen. Dies erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen, zum einen durch die Bindung spezifischer fluoreszenzmarkierter Kanalblocker (Verapamil) und zum anderen durch spezifische Antikörper gegen Kanaluntereinheiten.

Die Calciumkanäle sind heteromere Proteinkomplexe, die aus einer α_1 -Untereinheit, welche die Pore bildet und eine durch Disulfidbrücken verbundene $\alpha_2\delta$ -Untereinheit und eine β -Untereinheit, die regulatorische Funktion besitzt, bestehen. Im Organismus wurden verschiedene Untereinheiten dieses Calciumkanals gefunden, die sich nur im Aufbau ihrer α_1 -Untereinheit unterscheiden. Durch diesen Strukturunterschiede können sie von verschiedenen Substanzen blockiert werden (Reuter et al. 1996).

Man unterscheidet den L-, N-, und P/Q-Typ. Besonders die L- und N- Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung und Verstärkung von Schmerz auf spinaler Ebene (Vargas und Schaible 1996). Um diese Kanäle immunhistochemisch darzustellen, wurden in dieser Arbeit spezifische Antikörper gegen die verschiedenen Untereinheiten gewählt, die zusätzlich mit einem immunfluoreszierenden Sekundäntikörper gekoppelt waren.

2. Material und Methoden

2.1. Präparation des Gewebes

Insgesamt wurden 18 Mäuse mit einem Körpergewicht von ca. 35g durch eine Überdosis Thiopental (Trapanal, Byk Gulden) getötet.

Durch die Abpräparation der Haut an den Kniegelenken der Mäuse konnten die Knie freigelegt werden. Um die mediale und die laterale Kniegelenkscapsel entnehmen zu können, wurde hierzu jeweils ein Schnitt mit einem Skalpell parallel zum Ligamentum patellae und zum Ligamentum collaterale mediale bzw. Ligamentum collaterale laterale geführt. Durch zwei vertikal geführte Schnitte konnte die Kapsel freigelegt und dann vorsichtig abpräpariert werden. Die Kapseln wurden sofort in eine Pufferlösung (phosphate-buffered saline (PBS)) überführt.

2.2. Darstellung der Calciumkanäle

2.2.1. Immunhistochemischer Nachweis der Calciumkanal-Untereinheiten

Zur Darstellung der Calcium-Kanäle wurden spezifische Antikörper gegen die jeweilige Untereinheit gewählt.

Das Gewebe wurde für ca. zwei Stunden gründlich mit PBS, welches zusätzlich 0,1% NaN_3 (PBS+) enthielt, gewaschen und über Nacht in einer Fixationslösung, die 2% Paraformaldehyd in Puffer enthielt, aufbewahrt. Am nächsten Tag musste das Gewebe für 2

Stunden intensiv in PBS+ gewaschen werden (3x20min+2x30min) und in einer Alkoholreihe (10%; 25%; 40%; 50%; 40%; 25%; 10%) jeweils für fünf Minuten belassen werden, um eine ausreichende Antikörperpenetration zu gewährleisten. Anschließend wurde kurz mit frischem PBS+ (2x5min) gewaschen und danach für 2 Stunden vorinkubiert. Die Vorinkubation enthielt neben PBS+ noch 4% normales Ziegenserum (normal goat serum; NGS).

Nach einem weiteren kurzen Waschschriff (2x5min) mit PBS+ wurde zur Darstellung der CGRP-haltigen Fasern mit dem aus dem Meerschweinchen gewonnenen Antiserum (1:1000, Polyclonal CGRP-Antibody; DPC Biemann) inkubiert.

Um den L-Kanal darzustellen, enthielt die Inkubationslösung gleichzeitig das aus dem Kaninchen gewonnene Antiserum ($\text{anti}\alpha_1\text{C}$; 1:200; Alomone Laboratories). Das Gewebe blieb bei Raumtemperatur auf dem Schüttler für ca. 20 Stunden stehen. Am nächsten Tag wurde wiederum für ca. 20 Stunden mit frischem PBS+ gewaschen und anschließend die Sekundärantikörper hinzugegeben. Diese waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff CY_2 (1:150; Jackson Immuno Research) oder Cy_3 (1:500; Jackson Immuno Research) konjugiert. In dieser Lösung verblieben die Proben für ca. 20 Stunden bei Raumtemperatur.

Damit nichtgebundene Sekundärantikörper aus dem Gewebe entfernt werden konnten, musste nochmals gründlich für eine Stunde (3x20min) mit frischem PBS gewaschen werden. Nachdem das Gewebe noch für einen Tag bei Raumtemperatur im Puffer belassen wurde, konnte es auf einem Objekträger aufgezogen und in Fluor-Save-Reagent (Calbiochem) eingebettet werden. In Kontrollversuchen erfolgte eine Inkubation des Gewebes mit dem Antikörper (z.B. $\text{anti}\alpha_1\text{C}$) in Gegenwart des entsprechenden Antigens.

Zur Darstellung des N-Kanals wurde das Gewebe mit dem ebenfalls aus dem Kaninchen gewonnenem Antiserum ($\text{anti}\alpha_1\text{B}$; 1:200; Alomone Laboratories) inkubiert.

2.2.2. Darstellung des kombinierten Nachweises von Verapamil- bzw Conotoxin-Bindungsstellen an CGRP-positiven Nervenfasern

Nach der Entnahme wurde das Gewebe für ca. 2 Stunden gründlich mit PBS gewaschen. Im Anschluß inkubierte man die Proben mit dem fluoreszenzmarkierten Kanalblocker Bodipy-Verapamil (10-4mol/l) für 3 Stunden. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur auf einem Schüttler unter Lichtausschluß, da der fluoreszenzmarkierte Kanalblocker lichtempfindlich ist.

Nach diesem Schritt wurde für eine Stunde (6x10min) mit frischem PBS gewaschen. Über Nacht ruhte dann das Gewebe in einer Fixationslösung, die 2% Paraformaldehyd in Puffer enthält. Nach der Fixation wurde das Gewebe für 2 Stunden intensiv in PBS+ gewaschen (3x20min+2x30min) und in einer auf- bzw. absteigenden Alkoholreihe (10%; 25%; 40%;

50%; 40%; 25%; 10%) jeweils für fünf Minuten belassen, um eine ausreichende Antikörperpenetration zu gewährleisten.

Anschließend wurde kurz mit frischem PBS (2x5min) gewaschen und danach für zwei Stunden vorinkubiert. Die Vorinkubation enthielt neben PBS+ noch 4% NGS (normal goat serum).

Nach einem weiteren kurzen Waschschriff mit PBS+ (2x5min) konnte das aus dem Meeresschweinchen gewonnene Antiserum (1:1000, Polyclonal CGRP-Antibody; DPC-Biermann) zugegeben werden. Das verwendete Antiserum war zuvor in einer PBS-Lösung, die 1% NGS und 0,5% Triton enthielt, verdünnt worden. Bei Raumtemperatur blieb das Gewebe auf dem Schüttler über Nacht stehen.

Nachdem am darauffolgenden Tag die Kapseln intensiv für zwei Stunden mit PBS+ gewaschen (3y20min+2x30min) worden waren, konnte der fluorchromkonjugierte Sekundärantikörper (1:1200; Jackson Immuno Research) zugegeben werden. Bei Raumtemperatur wurde für ca. 20 Stunden inkubiert. Um nichtgebundene Sekundärantikörper aus dem Gewebe zu entfernen, wurde nochmals gründlich für eine Stunde (3x20min) mit frischem PBS gewaschen und die Kapseln dann für einen Tag bei Raumtemperatur im Puffer belassen.

Zur Darstellung der Conotoxin- Bindungsstellen wurde der gleiche Vorgang gewählt wie bei der Markierung der Verapamil-Bindungsstellen. Das Gewebe wurde mit ω -conotoxin GVIA (10-6mol/l, konjugiert mit Tetramethylrhodanin, einem 27-Aminosäurepeptid-Toxin aus der Kegelschnecke (*Conus geographus*)), inkubiert.

Im letzten Arbeitsschritt wurde das Gewebe auf einen Objektträger aufgezogen und in Fluor-Save-Reagent (Calbiochem) eingebettet. In den Kontrollversuchen ersetzte man den Sekundärantikörper bzw. den Kanalblocker durch einfaches PBS.

2.3. Auswertung

Für die lichtmikroskopische Darstellung des Nervenfaserverlaufs und der Calcium-Kanäle wurden die immungefärbten Gewebe zunächst bei 20facher Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop untersucht.

Es wurden confocale Bilder der Kapseln mit Hilfe eines Leica TCS NT-Mikroskops angefertigt und anschließend mit Amira (TGS inc.) bearbeitet.

Protokoll

zum immunhistochemischen Nachweis von Calcium-Kanal-Untereinheiten:

1. Tag	Waschen: <p style="text-align: center;">PBS + 0.1% NaN₃: x-mal</p>
	Fixierung: <p style="text-align: center;">Paraformaldehyd 2%, 16 Stunden</p>
2. Tag	Waschen: <p style="text-align: center;">PBS + 0.1% NaN₃: 3x20min+2x30min</p>
	Inkubation: mit Ethanol in PB <p style="text-align: center;">(10%; 25%; 40%; 50%; 40%; 25%; 10% je 5 min)</p>
	Waschen: <p style="text-align: center;">PBS + 0.1% NaN₃: 2x5min</p>
	Vorinkubation: mit PBS+ und 4% NGS <p style="text-align: center;">(2 Stunden)</p>
	Waschen: <p style="text-align: center;">PBS + 0.1% NaN₃: 2x5min</p>
	1. Antikörper: Polyclonal CGRP-Antibody, guinea pig; DPC Biermann; 1: 1000 in 0.12M PBS+ ANTI- α_1C / ANTI- α_1B Subunit of Voltage-Gated Ca ²⁺ Channel, rabbit; Alomone Laboratories; 1: 200 in 0.12M PBS+ <p style="text-align: center;">(ca. 20 Stunden)</p>

3. Tag	Waschen: PBS + 0.1% NaN ₃ : 3x20min + 2x30min
	2. Antikörper: CyTM2-conjugated AP Goat Anti Guinea pig IgG (H+L), Jackson Immuno Research Laboratories; 1:150 in 0.12M PBS+ CyTM3-conjugated AP Goat Anti Rabbit IgG (H+L), Jackson Immuno Research Laboratories; 1:500 in 0.12M PBS+ (ca. 20 Stunden)
4. Tag	Waschen: PBS + 0.1% NaN ₃ : 3x20min
5. Tag	Eindecken: mit Fluor-Save-Reagent (Calbiochem)

Anm.: PBS+: PBS, 0.1%NaN₃, 1% NGS (normal goat serum), Triton 0.5%,
0.25% BSA (bovine solution)

Protokoll

des kombinierten Nachweises von Verapamil- bzw. Conotoxin-Bindungsstellen
an CGRP-immunpositiven Nervenfasern:

1. Tag	Waschen: PBS + 0.1% NaN ₃ : x-mal
	Inkubation: BODIPY® FL verapamil, hydrochloride, Molecular Probes; 10 ⁻⁴ mol/l ω-conotoxin GVIA, tetramethylrhodamine conjugate, Molecular Probes; 10 ⁻⁶ mol/l (3 Stunden)
	Waschen: PBS + 0.1% NaN ₃ : 6x10min
	Fixierung: Paraformaldehyd 2%, 16 Stunden
2. Tag	Waschen: PBS + 0.1% NaN ₃ : 3x20min+2x30min
	Inkubation: mit Ethanol in PB (10%; 25%; 40%; 50%; 40%; 25%; 10% je 5min)
	Waschen: PBS + 0.1% NaN ₃ : 2x5min
	Vorinkubation: mit PBS+ und 4% NGS (2 Stunden)
	Waschen: PBS + 0.1% NaN ₃ : 2x5min
	1. Antikörper: Polyclonal CGRP-Antibody, guinea pig, DPC Biermann; 1:1000 in 0.1M PBS + 0.1% NaN ₃ + 1% BSA (ca. 20 Stunden)

3. Tag	<p>Waschen:</p> <p>PBS + 0.1% NaN₃: 2x30min+3x20min</p> <p>2. Antikörper: <u>Verapamil-Reihe</u>: CyTM₃-conjugated AP Goat Anti Guinea Pig IgG (H+L), Jackson Immuno Research Laboratories; 1:1200 in 0.12M PBS+</p> <p><u>Conotoxin-Reihe</u>: CyTM₂-conjugated AP Goat Anti Guinea Pig IgG (H+L), Jackson Immuno Research Laboratories; 1:150 in 0.12M PBS+ (ca. 20 Stunden)</p>
4. Tag	<p>Waschen:</p> <p>PBS + 0.1%NaN₃: 6x10min</p>
5. Tag	<p>Eindecken: mit Fluor-Save-Reagent (Calbiochem)</p>

3. Ergebnisse

3.1. Verteilung des L-Typ Calciumkanals

In den zu untersuchenden Geweben waren Fluoreszenz markierte Nervenfasern eindeutig zu erkennen. Diese Nervenfasern konnten über eine Strecke von bis zu mehreren 100 μm verfolgt werden. In Kontrollexperimenten, in denen der primäre Antikörper oder der Kanalblocker nicht zugegeben wurde, konnten keine markierten Nervenfasern beobachtet werden.

Nervenfasern mit einer positiven Immunreaktion für CGRP traten in unterschiedlichen Tiefen der Gelenkkapsel auf. In den oberen Schichten befanden sich hauptsächlich Fettzellen und Blutgefäße. Hier liefen die Nervenfasern in enger Nachbarschaft zu den Fettzellen und den Blutgefäßen. Die tieferen Schichten bestanden hauptsächlich aus Kollagenfasern. Hier waren nur vereinzelt Nervenfasern sichtbar. Alle markierten Nervenfasern waren dünn, mit einem Durchmesser von ungefähr $2\mu\text{m}$. Die Immunreaktion war entlang der Nervenfasern nicht gleichmäßig verteilt, sondern häufte sich, in Abständen von ca. $2\mu\text{m}$, periodisch an. Es konnten auch Nervenfasern beobachtet werden, die zu Bündeln zusammengelagert waren. Hier schien die CGRP- positive Immunreaktion viel gleichmäßiger aufzutreten.

Als das Gewebe mit dem Fluoreszenz gekoppelten Bodipy-Verapamil, einem spezifischen L-Typ Calciumkanalblocker, inkubiert wurde, zeigten sich intensiv markierte periphere Nervenfasern. Die Bindungsstellen waren nicht gleichmäßig über die Nervenfasern verteilt, sondern zeigten periodisch auftretende Anhäufungen (Abb.1). Daneben waren auch einige kleine Blutgefäße und nicht-neuronale Zellen eindeutig mit Bodipy-Verapamil angefärbt mit einer ungefähren Länge von $25\mu\text{m}$ und einer Breite von $10\mu\text{m}$. Diese Zellen zeigten eine unregelmäßige Form. Kombiniert man beide Fluoreszenz markierten Abbildungen, konnte man eine vollständige Kolokalisation der CGRP-positiven Immunreaktion und der Bodipy-Verapamil Bindungsstellen feststellen (Abb.1).

Vergleichbare Ergebnisse konnten nach der Markierung der L-Typ Calciumkanäle mit spezifischen Antikörpern gegen die $\alpha_1\text{D}$ -Untereinheit erzielt werden (Abb.2).

Auch hierbei konnte eine deutliche Kollokalisierung zwischen der CGRP-positiven Immunreaktion und dem L-Typ Calciumkanal beobachtet werden. Im Unterschied zu den Markierungen der Calciumkanäle war die Intensität bei der Verwendung mit Bodipy-Verapamil leider viel schwächer. Einige Nervenfasern hingegen zeigten nur eine Immunreaktion für den L-Typ Calciumkanal. Die oben erwähnten Zellen gingen keine Immunreaktion mit dem Fluoreszenz markierten Antikörper ein, wohingegen die Blutgefäße eindeutig Antikörperbindungsstellen für den L-Typ Calciumkanal aufwiesen (Abb.2).

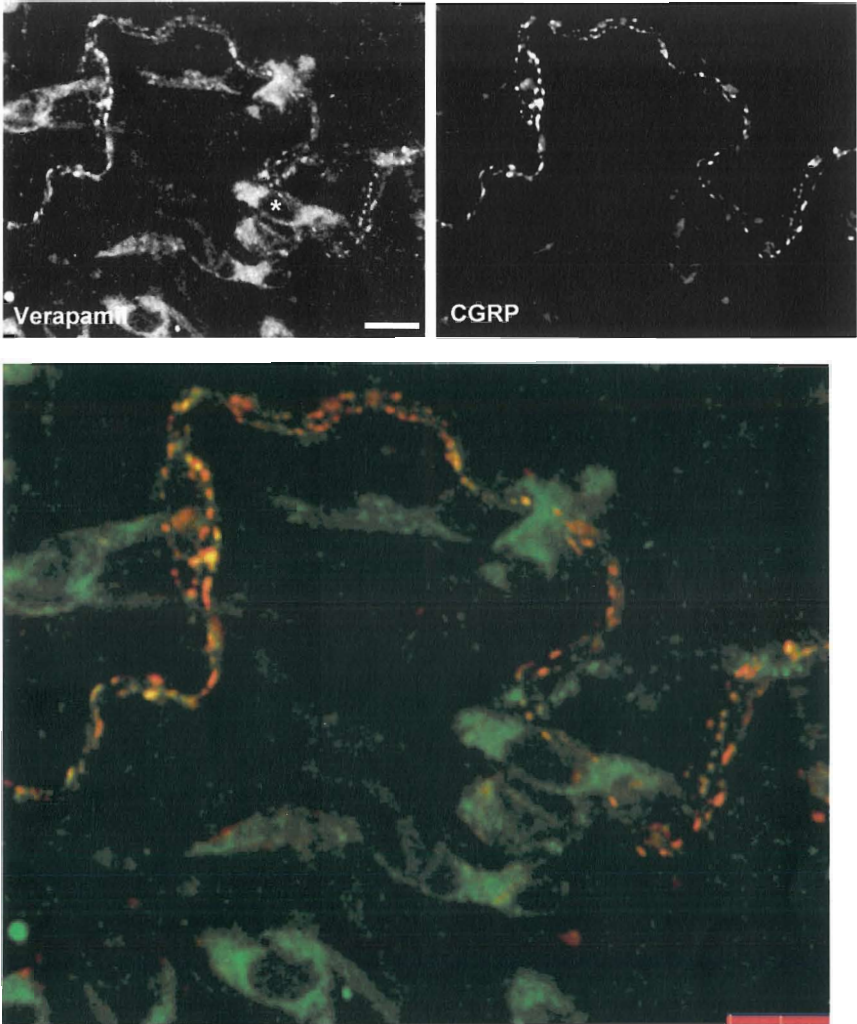


Abb.1: Konfokale Abbildungen der Verapamil-Bindungsstellen (grün) an CGRP-immunpositiven Nervenfasern (rot) in der Kniegelenkscapsel der Maus. Die Verapamil-Bindungsstellen sind kolokalisiert mit der CGRP Immunreaktion (gelb). Einige Zellen sind mit Bodipy-Verapamil markiert (*). Maßstab: 10 μ m.

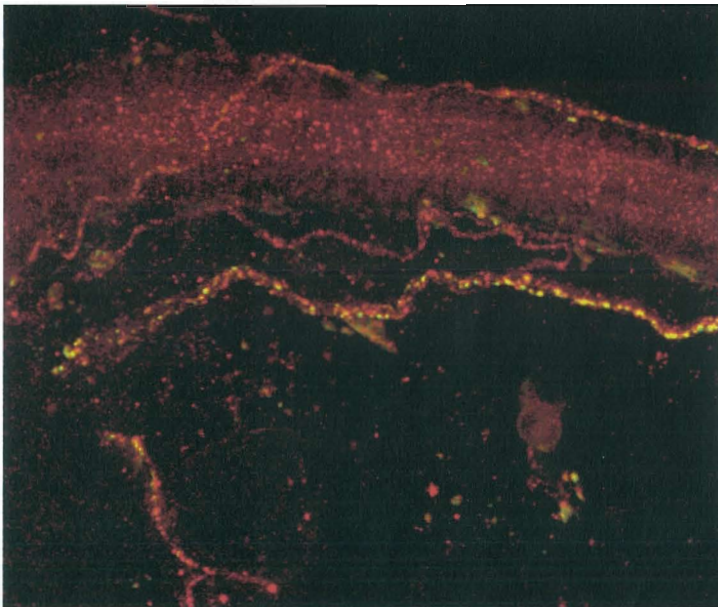
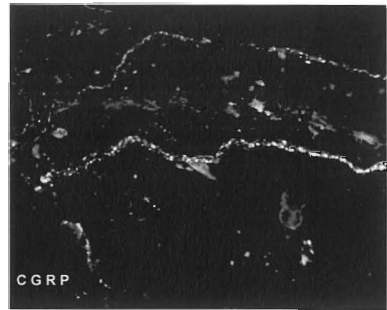
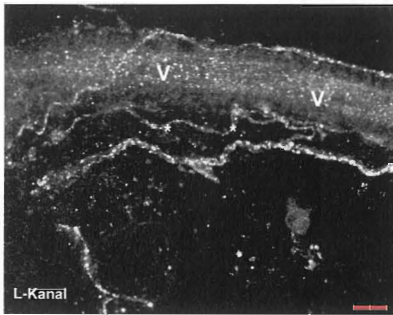


Abb.2: Abbildungen der Immunreaktion für den L-Typ Calcium-Kanal (rot) an CGRP immunpositiven Nervenfasern (grün) in der Kniegelenkscapsel der Maus (Kokalisation: gelb). Einige der Nervenfasern sind immunreaktiv für den L-Typ Calciumkanal ohne CGRP-ähnliche Immunreaktion (*). Auch Blutgefäße zeigten eindeutig Antikörperbindungsstellen (V). Maßstab: 10 μm .

3.2. Verteilung des N-Typ Calciumkanals

Die Bindungsstudien mit Tetramethylrhodamin konjugiertem ω -conotoxin GVIA, einem spezifischen N-Typ Calciumkanalblocker, zeigten eine schwache, aber eindeutige Anfärbung der Nervenfasern in der Kapsel des Kniegelenks (Abb.3).

Vergleichbar mit der Markierung des L-Typ Calciumkanals konnte auch hier eine periodische Anhäufung der Bindungsstellen entlang der gesamten peripheren Nervenfasern beobachtet werden. Kombiniert man die Abbildungen der ω -conotoxin Bindungsstellen mit denen der CGRP-positiven Immunreaktionen, zeigte sich eine eindeutige Kolo-kalisation. Diese Ergebnisse wurden weiterhin unterstützt durch die Verwendung von Antikörpern, welche spezifisch an die $\alpha_1\beta$ -Untereinheit des N-Typ Calciumkanals binden (Abb.4). Auch hier konnte eine vollständige Kolo-kalisation festgestellt werden. Im Gegensatz zu der Markierung des L-Typ Calciumkanals wurden keine anderen Strukturen, wie Blutgefäße oder nicht-neuronale Zellen, angefärbt.

Neben einzelnen Nervenfasern konnten auch kleine Nervenfaserbündel untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass die Reaktion des ω -conotoxin an den Faserbündeln viel ausgeprägter war als an den einzelnen Nervenfasern (Abb. 5).

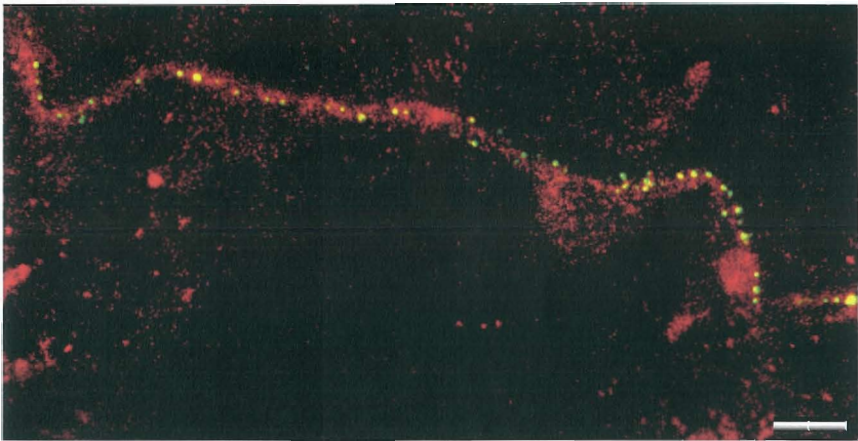
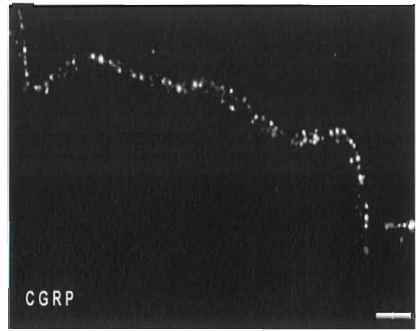
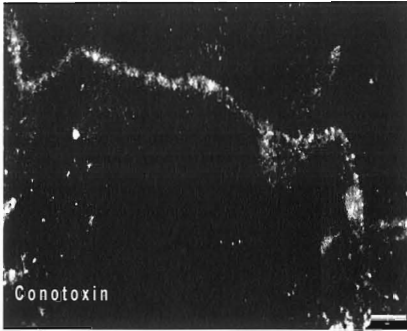


Abb.3: Konfokale Abbildungen zeigen eine eindeutige Kolo­kalisierung (gelb) zwischen der CGRP-positiven Immunreaktion (grün) und den ω -conotoxin (rot) Bindungsstellen des N-Typ Calciumkanals an einer Nerven­faser. Maßstab: 10 μ m.

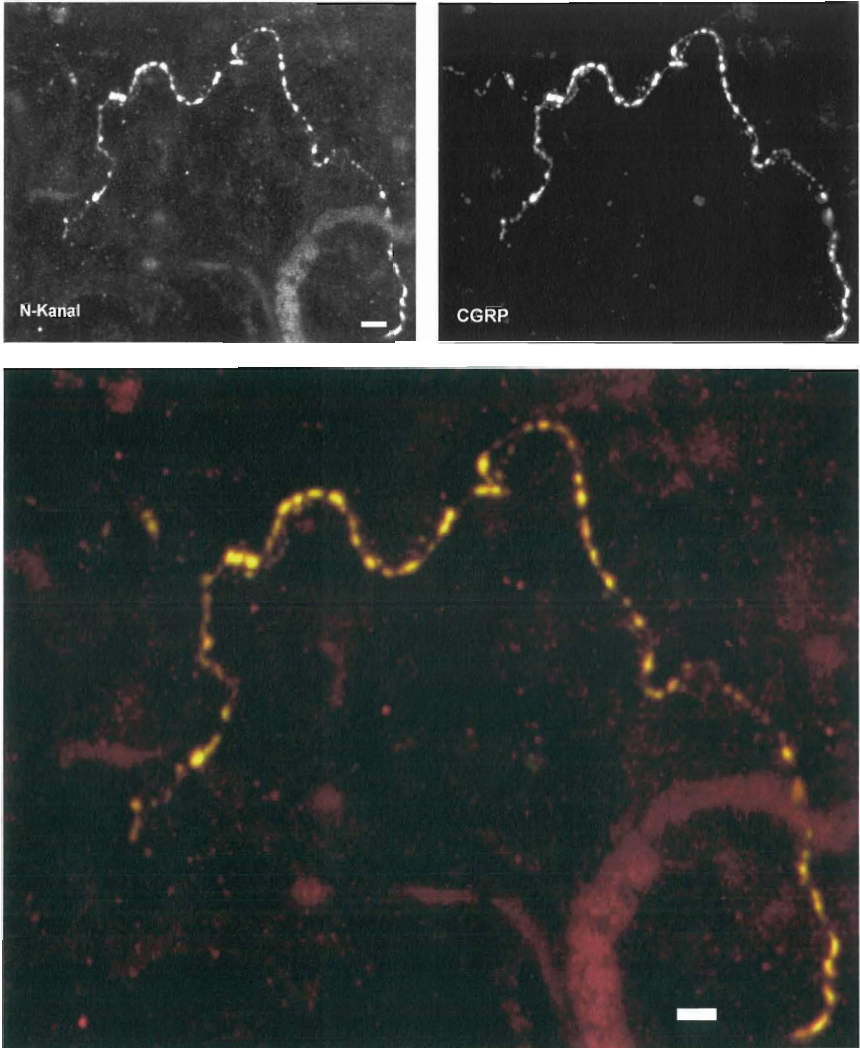


Abb.4: Kolokalisation (gelb) zwischen der CGRP-positiven Immunreaktion (grün) und der Immunreaktion des N-Typ Calciumkanals (rot). Maßstab: 10µm.

4. Diskussion

Das Vorhandensein spannungsabhängiger Calciumkanäle in den Spinalganglienzellen der Hinterwurzel des Rückenmarks konnte schon in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (Yusef et al 2001). Diese Studie zeigt erstmals eindeutig das Vorhandensein spannungsabhängiger Calciumkanäle an peripheren afferenten Nervenfasern.

Untersucht wurden diese Kanäle an dem bereits gut erforschten Kniegelenk der Maus. Im Kniegelenk der Maus besteht der überwiegende Anteil der afferenten Fasern aus denen der Gruppe III und IV, welche für die Weiterleitung nozizeptiver Information von Bedeutung sind (Ebinger et al. 2001). Diese afferenten Fasern enthalten Neuropeptide, wie zum Beispiel CGRP, welche bei nozizeptiven Vorgängen eine wichtige Rolle spielen. Aus diesem Grund wurde versucht, zunächst das Neuropeptid CGRP an afferenten Nervenfasern in den Kniegelenken der Maus nachzuweisen, um dann mittels Fluoreszenz markierte Antikörper bzw. Kanalblocker gegen die Calciumkanäle eine Kollokalisierung an den Fasern zu beweisen.

Zur Darstellung afferenter Nervenfasern der Gruppe III und IV wurde eine Immunreaktion in unterschiedlichen Tiefen der Gelenkkapsel gefunden. Die Innervationsdichte war in den oberflächlichen Kapselschichten eindeutig höher als in den tieferen. Ähnliche Studien haben dies schon gezeigt (Heppelmann et al 1997). Außerdem konnte elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden, dass die meisten Fasern in enger Nachbarschaft zu den kleinen Arterien verliefen. (Heppelmann et al 1997). Auch in unserem untersuchten Gewebe waren die meisten CGRP positiven Nervenfasern an Blutgefäßen, wie Abb.1 zeigt, zu beobachten.

Leider konnten die dargestellten Afferenzen nicht einer Gruppe zugeordnet werden. Es könnte sich um Nozizeptoren, aber auch um Mechanosensoren handeln, welche für den Stellungs- und Bewegungssinn des Gelenks im Raum von Bedeutung sind. Auch konnte mit dieser Methode nicht zwischen den einzelnen Gruppen von Fasern unterschieden werden. Die dickmyelinisierten Fasern der Gruppe II, welche ausschließlich Mechanosensoren, enthalten haben aber einen Durchmesser von 6-11 μm . Die marklosen (IV) bzw. dünn markhaltigen (III) Fasern, welche die Nozizeptoren enthalten, sind mit einem Durchmesser von 0.25-1.5 μm bzw. 1-6 μm wesentlich kleiner. Obwohl es nicht möglich ist, den Durchmesser der Fluoreszenz markierten Nervenfasern exakt zu bestimmen, scheinen sie so klein zu sein, dass sie von der Größe her zu der Gruppe III oder IV klassifiziert werden können. Außerdem wurde schon gezeigt, dass das Kniegelenk der Maus hauptsächlich von Nervenfasern dieser zwei Gruppen in-

nerviert wird. Eine Differenzierung zwischen diesen beiden Gruppen war jedoch nicht möglich

Die von uns beobachteten Nervenfasern waren entweder in kleinen Bündeln zusammengefasst, oder liefen einzeln in einer geraden Linie durch das Gewebe, vollständig angereichert mit dem Reaktionsprodukt CGRP. Die Immunreaktion war entlang der Nervenfasern aber nicht gleichmäßig verteilt, sondern zeigte in regelmäßigen Abständen von ca. 5µm Verdichtungen, so genannte „beads“. Derartige als „beads“ bezeichnete Strukturen, wie auch der Faserverlauf, konnten in gleicher Weise in früheren Arbeiten bereits beobachtet werden (Hepplmann et al. 1997). Somit handelt es sich auch hier eindeutig um afferente Nervenfasern der Gruppe III oder IV, da sie in der Lokalisation, Größe und Form eindeutig den Ergebnissen anderer Arbeiten entsprechen.

Calciumkanäle unterscheiden sich im Aufbau ihrer α 1-Untereinheit. Durch diesen Strukturunterschied können sie von verschiedenen Substanzen blockiert werden (Reuter 1996). Der L-Typ Calciumkanal besteht aus den Untereinheiten α_1C und α_1D und kann durch Dihydropyridine (z.B. Nifedipin), Phenylalkylamine (z.B. Verapamil), oder auch durch Benzodiazepine (z.B. Diltiazem) blockiert werden. Diesen Kanaltyp findet man hauptsächlich auf der Oberflächenmembran von Nervenzellkörpern und ihren proximalen Dendriten (Reuter 1996). In einem der verschiedenen Ansätze wurde das Gewebe neben CGRP zusätzlich mit Bodipy-Verapamil, einem Fluoreszenz gekoppeltem Calciumkanalblocker, inkubiert. Es zeigten sich markierte Nervenfasern, die sich eindeutig sowohl mit CGRP als auch mit Bodipy-Verapamil anfärben ließen. Auch Verapamil regierte entlang der gesamten Nervenfaser und zeigte dieselben periodisch angehäuften Verdichtungen wie CGRP. Somit konnte eine eindeutige Lokalisation nachgewiesen werden.

Es handelt sich bei diesen Nervenfasern also eindeutig um sensorische Nervenafferenzen, welche eine hohe Dichte an spannungsabhängigen Calciumkanälen vom L-Typ aufwiesen. Es konnte eine Nervenfaser gefunden werden, die zwar Calciumkanäle enthielt, aber kein CGRP (Abb. 2). Vielleicht handelt es sich hierbei um eine afferente Faser, die kein CGRP enthielt, oder die Konzentration an CGRP in dieser Faser war für die Darstellung zu gering.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden die L-Typ Calciumkanäle mit spezifischen Antikörpern markiert. Hier zeigte sich das gleiche Ergebnis. Die Intensität der Färbung war jedoch

wesentlich höher. Der Grund hierfür könnte in der Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung liegen. Antikörper binden spezifisch an ein bestimmtes Antigen. Die Calciumkanalblocker andererseits binden wahrscheinlich nicht so fest an den Calciumkanälen. Ein anderer Grund könnte sein, dass Verapamil durch die häufigen Waschschriffe wieder ausgewaschen wurde, da es sehr hydrophil ist.

Überraschenderweise zeigte sich die relative Unspezifität der Calciumkanalblocker darin, dass Verapamil auch an Zellen im Gewebe band, bei denen eigentlich keine Immunreaktion mit Calciumkanäle vom L-Typ zu erwarten gewesen wäre. Dies kann man vielleicht damit erklären, dass Verapamil hier an andere Arten von Ionenkanälen bindet. Es könnte sich hierbei um calciumabhängige Kaliumkanäle handeln, welche man an Blutgefäßen und Leukozyten gefunden hat (Harper et al 2001, Jensen et al 1998, Rittenhouse et al 1997). In den Endothelzellen von Blutgefäßen sind sie an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt. In wandernden Zellen scheint der calciumabhängige Kaliumkanal eine Rolle in der Zellbewegung zu spielen (Schwab et al 1999). Aufgrund der Größe und Form der Verapamil markierten Zellen könnte es sich um wandernde Leukozyten handeln.

Der N-Kanal besteht aus der Untereinheit $\alpha_1\text{B}$ und kann durch ω -Conopeptide (ω -conotoxin GVIA) blockiert werden. Diesen Kanaltyp findet man hauptsächlich auf der präsynaptischen Seite von Nervenendigungen und er trägt dort zur Transmitterfreisetzung bei. Solche Transmitter sind zum Beispiel Glutamat, Acetylcholin, Dopamin, Norphenephrin, GABA oder CGRP (Reuter 1996). Besonders eingehend wurde die Funktion des N-Kanals am Rückenmark von Ratten untersucht. So verringerte sich das Antwortverhalten spinaler nozizeptiver Neurone auf mechanische Reizung um 35% nach Gabe von Conotoxin (ctx) GVIA (Neugebauer U et al. 1996). Entsprechend zeigten Ratten in Verhaltensversuchen, deren Knie einer Entzündung ausgesetzt sind, kaum Schmerzverhalten, wenn ihnen vorher in das Hinterhorn des Rückenmarks Conotoxin injiziert wurde (Nebe et al 1998). Somit spielen auch die Calciumkanäle vom N-Typ eine wichtige Rolle in der Weiterleitung und Verarbeitung von Schmerz.

In dieser Arbeit konnte eindeutig der N-Typ Calciumkanal immunhistochemisch nachgewiesen werden. Auch hier fand sich eine eindeutige Kolo-kalisation mit CGRP. Leider musste ähnlich wie bei der Markierung des L-Kanals festgestellt werden, dass auch hier die Markierung durch einen Kanalblocker viel schwächer sichtbar war, als die spezifische Antikörper-

bindung. Ansonsten zeigten auch diese immunhistochemischen Darstellungen die gleichen periodischen Anhäufungen wie bei der Darstellung der L-Typ Calciumkanäle.

An feinen Gelenkafferenzen scheinen sich also spannungsabhängige Calciumkanäle auch an den peripheren Nervenfasern zu befinden. Ein weiterer Beleg für die Existenz dieser Kanäle konnte durch elektrophysiologische Untersuchungen erbracht werden (Just und Heppelmann 2003). In dieser Studie wurde der Einfluß der Calciumkanalantagonisten für den L-Typ und den N-Typ auf die Mechanosensitivität unmyelinisierter und dünn myelinisierter Afferenzen im Kniegelenk der Ratte untersucht. Verapamil und Conotoxin verringerten die Mechanosensitivität in den meisten Nervenafferenzen deutlich (Just und Heppelmann 2003).

Im Rückenmark spielen spannungsabhängige Calciumkanäle in der Weiterleitung von sensorischer Information einschließlich der Nozizeption eine wichtige Rolle. Die Gabe von spezifischen Calciumkanalblockern kann subjektiven Schmerz verringern oder sogar verhindern. Auch die Wahrnehmung von Reizen als schmerzhaft, die normalerweise nicht schmerzhaft sind (Allodynie) und gesteigertes Schmerzempfinden (Hyperalgesie), wird durch die Blockade positiv beeinflusst. Dies wurde in verschiedenen experimentellen und klinischen Studien gezeigt (Vanegas and Schaible 2000).

Die Therapie bei der Behandlung chronischer und postoperativer Schmerzen setzt hauptsächlich bei der Verarbeitung von Signalen im Rückenmark und im Gehirn an. Die Hemmung zahlreicher Neurotransmitter, wie zum Beispiel Glutamat oder Acetylcholin, auf Rückenmarksebene bewirkt eine Analgesie (Eisenach 1999). Aber auch durch die Blockade von Calciumkanälen, besonders des N-Kanaltyps durch Ziconotid, einem ω -conotoxin, konnte nach intrathecaler Gabe Schmerzen bei Patienten signifikant reduziert werden, die über Jahre hinweg an chronischen Schmerzen litten und bei denen Opiate ohne Wirkung waren. (Heppelmann 2002). In dieser Forschungsarbeit konnten diese Calciumkanäle auch an primären afferenten Nervenfasern eindeutig nachgewiesen werden. Es liegt auf der Hand, dass durch Blockade dieser Calciumkanäle an primären afferenten Nervenfasern bereits am Ort der Entstehung einer Entzündung eingegriffen werden könnte. Die reduzierte Freisetzung von Neuropeptiden könnte vielleicht das Ausmaß einer Entzündung schon im peripheren Gewebe verringern, und somit einen neuen möglichen Angriffspunkt in der Bekämpfung akuter und chronischer Schmerzen bilden.

5. Zusammenfassung

Die afferente Funktion (Erregbarkeit) und die efferente Funktion (Freisetzung von Neuropeptiden aus primären Afferenzen) basiert auf einem Calciumeinstrom. Das Ziel der vorliegenden Studie war es, nachzuweisen, ob spannungsabhängige Calciumkanäle vom L- und N-Typ an sensorischen Nervenendigungen in der Kniegelenkscapsel der Maus darstellbar sind. Es wurden spezifische Fluoreszenz gekoppelte Kanalblocker und Antisera gegen diese Calciumkanal-Subtypen verwendet. Um zu zeigen, dass es sich um afferente Nervenfasern handelt, wurde das Gewebe gleichzeitig mit einem Fluoreszenz gekoppelten Antikörper gegen calcitonin gene-related peptide (CGRP), einem Neuropeptid, welches in primären Afferenzen weit verbreitet ist, inkubiert. Es konnte eine fast vollständige Kollokalisierung der CGRP Immunreaktion und der Bindungsstellen von ω -conotoxin GVIA oder Bodipy-Verapamil, welche das Vorhandensein von L- und N-Typ Calciumkanälen zeigten, festgestellt werden.

Diese Ergebnisse wurden durch identische Befunde nach einer immunhistochemischen Darstellung von zwei Calciumkanaluntereinheiten an CGRP-immunpositiven Nervenfasern bestätigt.

6. Literaturverzeichnis

Bertolino M, Llinas RR (1992) The central role of voltage-activated and receptor-operated Calcium channels in neuronal cells. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32:399-421

Ebinger M, Schmidt RF, Heppelmann B (2001) Composition of the medial and posterior articular nerves of the mouse knee joint. *Somatosens Mot Res.* 18:62-5

Eisenach DC (1999) Muscarinic-mediated analgesia. *Life Sci* 64:549-554

Gronblad M, Konthiness YT, Korkala O, Liesi P, Hukkanen M, Polak JM (1988) Neuropeptides in synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol.* 15:1807-10

Harper AA, Catacuzzeno L, Trequattrini C, Petris, Francolini F (2001) Verapamil block of large-conductance Ca-activated K channels in rat aortic myocytes. *J. Membr. Biol.* 179:103-11.

Heppelmann B (2002) Neue Ansätze in der zentralen Analgesie. *Pharamazie in unserer Zeit.* 31. Jahrgang 2002 Nr1

Heppelmann B, Messlinger K, Schmidt RF (1988) Morphological characteristics of the innervation of the cat's knee joint. *Agents Actions.* 25:225-7.

Heppelmann B, Pawlak M (1997) Inhibitory effect of somatostatin on the mechanosensitivity of articular afferents in normal and inflamed knee joints of the rat. *Pain.* 73:377-82

Heppelmann B, Pfeffer A, Schaible HG, Schmidt RF (1986) Effects of acetylsalicylic acid and indomethacin on single groups III and IV sensory units from acutely inflamed joints. *Pain.* 26:337-51

Heppelmann B, Shabazian Z, Hanesch U (1997) Quantitative examination of calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerve fibres in the cat knee joint capsule. *Anat. Embryol.*, 195:525-530

Herbert MK, Holzer P (2002) Neurogenic Inflammation. II Pathophysiology and clinical Implications. *Anesthesiol Intensivmed Notfall* 27:386-394

Jensen B, Strobaek D, Christophersen P, Jorgensen T, Hansen C, Silaharoglu A, Olesen S, Ahring (1998) Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺-channel. *Am. J. Physiol.* 275:848-856

Just S, Heppelmann B, (2003) Voltage-gated calcium channels may be involved in the regulation of the mechanosensitivity of slowly conducting knee joint afferents in rat. *EXP Brain Res* 150:379-384

Just S, Pawlak M, Heppelmann B (2000) Responses of fine primary afferent nerve fibres innervating the rat knee joint to defined torque. *J. Neurosci. Methods.* 103:157-62

Mansvelder HD, Kits KS (2000) Calcium channels and the release of large dense core vesicles from neuroendocrine cells: spatial organization and functional coupling. *Review* 62:427-41

Mapp PI, Kidd BL, Gibson SI, Terry IM, Revell PA, Ibrahim NB, Blake DR, Polak IM (1990) Substance P-, calcitonin gene-related peptide- and C-flanking peptide of neuropeptide Y-immunoreactive fibres are present in normal synovium but depleted in patients with rheumatoid arthritis. *Neuroscience* 37:143-53

Nasu F (1999) Analysis of calcitonin gene related peptide (CGRP)-containing nerve fibres in the rat spinal cord light and electron microscopy. *J. Electron. Microsc.* 48:267-275

Nebe J, Vanegas H, Schaible HG (1998) Spinal application of omega-conotoxin GVIA, an N-type calcium channel, attenuates enhancement of dorsal spinal neuronal responses caused by intra-articular injection of mustard oil. *Exp Brain Res* 120:61-9

Neugebauer U, Vanegas H, Nebe J, Rumenapp P, Schaible HG (1996) Effects of N- and L-type calcium channels antagonists and the response of nociceptive spinal cord neurons to mechanically stimulation of the neuronal and the inflamed knee joint. *J. Neurophysiol* 76:3740-9

Potier B, Dutar P, Lamour Y (1993) Different effects of ω -conotoxin GVIA at excitatory and inhibitory synapses in rat CA1 hippocampal neurons. *Brain Res* 616:236-241

Reuter H (1996) Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. *Current Opinion in Neurobiology* 6:331-337

Rittenhouse AR, Vandorpe DH, Brugnara C, Alper SL (1997) The antifungal imidazole clotrimazole and its major in vivo metabolite are potent blockers of the calcium-activated potassium channel in murine erythroleukemia cells. *J. Membr. Biol.* 157:177-1991.

Schaible HG, Grubb BD (1993) Afferent and spinal mechanism of joint pain. *Pain* 55:5-54

Schwab A, Schuricht B, Seeger P, Reinhardt J, Dartsch PC (1999) Migration of Transformed renal epithelial cells is regulated by K⁺ channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume. *Eur. J. Physiol.* 438:330-337.

Vanegas H, Schaible H (2000) Effects of antagonists to high threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia: *Pain*. 85:9-18. Review

Yusef SP, Goodman J, Pinnock RD, Dixon AK, Lee K (2001) Expression of voltage-gated calcium channel subunits in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 311:137-141

Zimmer A, Zimmer AM, Baffi J, Usdin T, König K, Reynolds K, Palkovits M, Mezey E (1998) Hypoalgesia in mice with a target deletion of the tachykinin 1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2630-2635

Danksagung

Besonders möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. B. Heppelmann für die Überlassung des Themas und die unbürokratischen Rahmenbedingungen, sowie für die Betreuung der Arbeit danken. Besonders hervorzuheben sind die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit sowie die schnell Korrektur der Arbeit.

Danken möchte ich allen Mitarbeitern am Institut für Physiologie der Universität Würzburg, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich danke ich ganz besonders meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mir währenddessen immer zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Carsten Leipold-Büttner
Geburtsdatum	13. August 1976
Geburtsort	Leonberg
Konfession	evangelisch
Familienstand	ledig

Schulbildung

09/1983-07/1984	Grundschule Enzweihingen/ Württemberg
09/1984-07/1987	Grundschule Immenstadt/ Allgäu
09/1987-07/1990	Auwald-Gymnasium Immenstadt
09/1990-07/1993	Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium/ Fürth
09/1993-07/1996	Modellschule Obersberg Bad Hersfeld
	Abschluß mit Allgemeiner Hochschulreife

Bundeswehr

07/1996-05/1997	Mühlhausen/ Thüringen
-----------------	-----------------------

Hochschulbildung

04/1997-09/1999	Vorklinisches Studium an der Universität Würzburg
10/1999-09/2003	Klinisches Studium an der Universität Würzburg
10/2003-09/2004	Praktisches Jahr
24.11.2004	Abschluß des Medizinstudiums mit Bestehen des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
06.12.2004	Assistenzarztstelle in der Inneren Medizin des Caritas-Krankenhaus Bad Mergentheim

Doktorarbeit

Prof. Dr. Heppelmann
Physiologisches Institut der Universität Würzburg
Thema: Histological demonstration of voltage dependent calcium channels on calcitonin gene related-immunoreactive nerve fibres in the mouse knee joint.

Veröffentlichung in Neuroscience Letters am 09.08.2001



