

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Aus der Abteilung für Experimentelle Unfallchirurgie  
der Klinik und Poliklinik für Hand-, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie  
Direktor Prof. Dr. med. J. M. Rürger

## **Darstellung von Nervenfasern im Knochen der Maus**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Dagmar Dorothea Hartmann

aus Bromberg

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 23.11.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. M. Amling

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. T. Schinke

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. A. Niemeier

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Arbeitshypothese und Fragestellung .....</b>	<b>2</b>
<b>3. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
3.1. Der Knochen.....	3
3.2. Die Knochenzellen .....	3
3.3. Regulation des Knochenstoffwechsels .....	6
3.4. Calcitonin-Gen-Related-Peptide (CGRP).....	8
3.5. CGRP-defiziente Mausmodelle.....	10
<b>4. Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
4.1. Materialien .....	11
4.2. Paraffineinbettung der Knochen .....	11
4.3. Entparaffinierung der Paraffinschnitte.....	13
4.4. Silber-Imprägnation von Nerven, Methode nach Linder (1978) .....	13
4.5. Versilberungsmethode nach Bodian .....	13
4.6. Immunhistologie nach der Streptavidin-Biotin-Methode.....	14
4.7. Immunfluoreszenz .....	15

<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>17</b>
5.1. Darstellung von Nervenfasern mittels der Versilberungsmethoden .....	17
5.2. Immunhistochemische Darstellung von Nervenfasern .....	21
5.3. Darstellung von Nervenfasern mittels der indirekten Immun-fluoreszenz .....	26
5.4. CGRP-positive Nervenfasern im Knochen.....	28
5.5. Calc1-defiziente Mäuse .....	32
<b>6. Diskussion</b> .....	<b>34</b>
6.1. Neuronale Regulation der Knochendichte .....	34
6.2. CGRP am Knochen .....	36
6.3. Klinische Relevanz .....	37
<b>7. Zusammenfassung</b> .....	<b>39</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>41</b>
<b>9. Danksagung</b> .....	<b>48</b>
<b>10. Erklärung</b> .....	<b>49</b>

### 1. Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	destilliertes Wasser
BMPs	<u>b</u> one <u>m</u> orphogenic <u>p</u> roteins
BSA	bovines Serumalbumin
CGRP	Calcitonin-gene-related-peptide
$\alpha$ -CGRP	alpha-Calcitonin-gene-related-peptide
$\beta$ -CGRP	beta-Calcitonin-gene-related-peptide
CT	Calcitonin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
HRP	Meerrettichperoxidase ( <u>H</u> orser <u>a</u> dish <u>p</u> eroxidase)
NF	Neurofilament
NGS	normales Kälberserum ( <u>N</u> ormal <u>g</u> oat <u>s</u> erum)
NPY	Neuropeptide Y
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin-ligand
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
RANKL	Osteoprotegerin-ligand
SP	Substanz P
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung ( <u>t</u> ris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
TH	Tyrosin Hydroxylase

### **2. Arbeitshypothese und Fragestellung**

Da sich seit geraumer Zeit die Hinweise darauf mehrten, dass das zentrale Nervensystem einen nicht unerheblichen Anteil an der Regulation des Knochenstoffwechsels hat, war es Ziel dieser Doktorarbeit, eine morphologische Darstellung von Nervenfasern im Knochen von Mäusen zu liefern. Besonders zu erwähnen seien dabei vor allem die Studien- und Forschungsergebnisse, welche im Zusammenhang mit der Untersuchung der Wirkungsweise des Hormons Leptin auf den Knochenstoffwechsel das sympathische Nervensystem als efferenter Schenkel der hypothalamischen Regulation des Knochenbaus postulierten (Ducy et al., 2000, Takeda et al., 2002).

Die vorliegende Arbeit sollte eine komplette Darstellung der Nervenfasern, insbesondere der CGRP-haltigen Nervenfasern der Mäuse-Tibiae, Mäuse-Femora und Mäuse-Wirbelsäulen liefern.

### 3. Einleitung

#### 3.1. Der Knochen

Der Knochen ist ein vielseitiges Organ, das eine Vielzahl wichtiger Funktionen im Organismus wahrnimmt. Vorrangig sei an dieser Stelle seine Funktion als Stützgewebe genannt. Zudem hat der Knochen auch eine Schutzfunktion, z.B. für das Gehirn oder das blutbildende Knochenmark. Eine weitere Bedeutung des Knochens liegt darin, dass er ein wichtiges Stoffwechseldepot darstellt. Im Skelettsystem des Menschen sind etwa 99% des Kalziums und 70% des Phosphats des gesamten Körpers enthalten, welche im Bedarfsfall rasch über eine Stimulation der Knochenresorption mobilisiert werden können. Damit wird die Serumkonzentration dieser Substanzen konstant gehalten.

Der Knochen besteht aus einer organischen Matrix, welche zu 95% aus Typ-I-Kollagen besteht. Die verbleibenden 5 % setzen sich aus Proteoglycanen und verschiedenen nicht-kollagenen Proteinen zusammen. Ihre Härte erhält diese Matrix durch die Mineralisierung, d.h. durch die Einlagerung anorganischer Salze. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Phosphat und Calcium, welche in Form des Hydroxylapatits gebunden, eingelagert werden.

#### 3.2. Die Knochenzellen

Im Rahmen seiner Bedeutung als Stützorgan vereinigt der Knochen physikalische Härte mit biologischer Plastizität. Diese Eigenschaften erhält der Knochen dank der koordinierten Tätigkeit zweier wichtiger Knochenzelltypen, den Osteoklasten und den Osteoblasten. Osteoblasten stammen von undifferenzierten mesenchymalen Vorläuferzellen ab (Ash et al. , 1980) und sind für den Knochenaufbau zuständig, indem sie die organische Knochenmatrix, das Osteoid, synthetisieren und dessen Mineralisation regulieren. Die Osteoklasten gehen aus hämatopoietischen Zellen hervor und bauen, durch die Sekretion diverser Phosphatasen und Proteasen, Knochen ab.

### 3. Einleitung

---

Die Tätigkeit dieser beiden Zelltypen ermöglicht im gesunden Organismus einen kontinuierlichen Knochenumbau, der sich aus der Kombination zweier umschriebener Prozesse, die sequenziell aufeinander folgen, zusammensetzt. Zunächst erfolgt die Resorption des bereits vorhandenen Knochens durch die Osteoklasten. Anschließend bilden Osteoblasten neuen Knochen, indem sie eine kollagenreiche Matrix (Osteoid) bilden, die anschließend mineralisiert. Ziel dieses immerwährenden Knochenumbaus ist der Erhalt der Knochenmasse, bei gleichzeitiger Anpassung der Knochenarchitektur an sich ändernde Lebensumstände und, damit verbunden, wechselnde statische Anforderungen an das Skelettsystem.

Eine weitere im Knochen vorkommende Zellart sind die Osteozyten. Hierbei handelt es sich um reife Osteoblasten, die innerhalb der mineralisierten Knochenmatrix zu finden sind und für deren Aufrechterhaltung sorgen (Buckwalter et al. , 1995a). Osteozyten findet man eingemauert in den Lakunen der Knochenmatrix. Untereinander sind sie durch feine, filopodiale, in den Knochenkanälen verlaufende Fortsätze verbunden.

Als weitere Knochenzellart seien die sogenannten „bone-lining cells“ genannt. Hierbei handelt es sich um flache, inaktive Zellen, welche die Oberfläche derjenigen Knochen bedecken, die keinem Umbauprozess unterzogen werden. Über die Bedeutung und Funktion der „lining cells“ ist noch wenig bekannt, es wird jedoch vermutet, dass es sich bei diesen Zellen um Osteoblasten-Vorläuferzellen handeln könnte.

Eine bedeutende Störung dieser koordinierten Abläufe, die den Knochenumbauprozess darstellen, ist die Osteoporose. Es handelt sich dabei um eine systemische Skeletterkrankung, bei der es über eine kritische Verminderung der Knochenmasse und Störung der knöchernen Mikroarchitektur zu einer verminderten Bruchfestigkeit des Knochens kommt. (WHO 1994). Klinisch tritt die Osteoporose am häufigsten in den beiden Manifestationsformen der Wirbelkörperfraktur und der meist durch einen Sturz ausgelösten peripheren Fraktur auf.



### 3. Einleitung

---

Dabei handelt es sich um eine Reduktion der Knochenmasse (WHO Definition: T-Wert kleiner -2,5), die unter anderem das Auftreten von Sinterungsfrakturen sowie eine generelle Fraktur­neigung der Betroffenen zur Folge hat. Radiologisch kann man die Diagnose Osteoporose an der reduzierten Knochendichte im Röntgen stellen. Morphologisch äußert sich die Osteoporose in einer Verschmälerung oder auch einem Verlust der Knochentrabekel. Der initialen Rarefizierung der Spongiosa folgt im nächsten Stadium der Osteoporose ein Verlust der Kortikalis. Ursache dieses Knochenmasseverlustes ist ein Missverhältnis zwischen den Funktionen der Osteoblasten und Osteoklasten, mit einem Überwiegen der osteoklastären Resorption gegenüber einem vermindertem Knochenaufbau durch die Osteoblasten.

Die Osteoporose ist im deutschsprachigen Raum ein gesellschaftlich und ökonomisch prioritäres Gesundheitsproblem. Vereinfacht dargestellt beträgt in Europa die 10-Jahreswahrscheinlichkeit für morphometrisch nachweisbare Wirbelkörperverformungen für 50 bis 80-jährige Frauen etwa 10%. Für Männer liegt sie bei etwa 6%. Solche Verformungen können verschiedene Ursachen haben, sind aber zu einem großen Teil durch eine Osteoporose bedingt. Die 10-Jahreswahrscheinlichkeit für nicht-vertebrale Frakturen zwischen dem 50. und 80. Lebensjahr beträgt etwa 19% bei Frauen und 7% bei Männern. Es gibt kaum systematische Untersuchungen zur Beantwortung der Frage, wie viele dieser peripheren Frakturen bei älteren Personen auf eine Osteoporose zurückgehen. Der Anteil dürfte aber hoch sein. Osteoporotische Frakturen führen nicht nur zu irreversiblen Einbußen an Lebensqualität und Behinderungen, sondern sie verursachen nach konservativen Schätzungen in Deutschland derzeit jährlich auch etwa 2,5-3 Mrd. € an direkten und indirekten Kosten. Hochrechnungen zufolge wird das Problem der Fragilitätsfrakturen in den kommenden Jahrzehnten aufgrund der demographischen Entwicklung um ein Vielfaches zunehmen. Das ist mit der Grund dafür, warum die WHO die Osteoporose auf die Liste der 10 wichtigsten Erkrankungen gesetzt hat.

Vor diesem Hintergrund wird deutlich, wie bedeutsam die Erforschung der molekularen Regulationsmechanismen des Knochenstoffwechsels ist, da sie den Schlüssel zu einer effizienten Therapie, bzw. zur Prävention der Osteoporose darstellen. Dies

würde eine immense Entlastung des Gesundheitswesens, sowie einen enormen Anstieg der Lebensqualität der an Osteoporose erkrankten Patienten bedeuten.

#### 3.3. Regulation des Knochenstoffwechsels

Bislang ist immer noch sehr wenig über die Regulation des Knochenstoffwechsels bekannt. Systemische, die Funktion der Knochenzellen beeinflussende Faktoren sind unter anderem das Parathormon, die Sexualhormone, Glukokortikoide, das 1,25-dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>, Calcitonin, Insulin, das Wachstumshormon sowie die Schilddrüsenhormone. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl lokaler, auto- und parakriner Faktoren, wie zum Beispiel die BMP's (Bone Morphogenic Proteins) und die Zytokine OPGL (auch RANKL genannt) und OPG, die die Funktion der Osteoblasten und Osteoklasten beeinflussen und aneinander koppeln. Daneben konnte gezeigt werden, dass beispielsweise die Zytokine OPG und RANKL neben ihrer parakrinen Funktionsweise auch einen systemischen Einfluss auf die Differenzierung von Osteoklasten nehmen (Lacey et al, 1998; Simonet et al., 1997).

Es mehren sich jedoch die Hinweise darauf, dass es noch weitere Arten der Knochenregulation, welche über einen zentralen Regelmechanismus vermittelt werden, gibt. Als klinisches Beispiel sei der M. Sudeck, auch sympathische Reflexdystrophie genannt, erwähnt. Hierbei handelt es sich um eine, in ihrer Ätiologie bislang noch nicht ganz klare, neurovaskuläre Fehlregulation mit inadäquater sympathischer und vasomotorischer Reflexantwort. Folge dieser Erkrankung ist, neben einer ausgeprägten Durchblutungsstörung und Ödemneigung, auch eine massive Knochendichteminderung der betroffenen Extremität. Eine Therapiemöglichkeit dieser Erkrankung besteht in der Gabe von Beta-Blockern, Medikamenten, die die Wirkung von  $\beta$ -sympathomimetischen Substanzen durch Blockade peripherer und teilweise auch zentraler  $\beta$ -Rezeptoren aufheben und somit einen inhibitorischen Einfluss auf über diese Rezeptoren vermittelten Wirkungen des sympathischen Nervensystems haben (Schwartzman, 2000).

Untersuchungen des Einflusses des Hormons Leptin auf den Knochen geben weitere Hinweise dafür, dass der Knochen unter anderem, neben der auto-/parakrinen, einer zentralen Regulation seines Stoffwechsels durch das sympathische Nervensystem unterliegt. Leptin ist ein von den Adipozyten produziertes und sezerniertes Hormon, das seinen, die Knochenformation hemmenden Effekt nicht, wie bisher für den Knochenstoffwechsel postuliert, auf auto-/parakrinem oder systemisch-endokrinem Weg ausübt, sondern seine Wirkung über den Hypothalamus und das sympathische Nervensystem (Sato et al., 1999, Young et al., 1983) entfaltet. Durch Untersuchungen an Leptin-, und Leptin-Rezeptor-defizienten Mäusen, sowie mittels Parabioseexperimenten, konnte nachgewiesen werden, dass nur Gaben von Leptin über den dritten Ventrikel in den Hypothalamus, nicht jedoch dessen systemisch-intravenöse Gaben, einen negativen Effekt auf die Knochenformation bewirken konnten (Ducy et al., 2000, Takeda et al., 2002). Darüber hinaus konnten die Autoren nachweisen, dass die Wirkung des Leptin direkt über das sympathische Nervensystem, vornehmlich über den ventromedialen Kern des Hypothalamus vermittelt wird. Hierbei zeigte sich, dass Voraussetzung für den die Knochenformation hemmenden Einfluss des Leptin ein funktionsfähiges sympathisches Nervensystem ist. Der negative Effekt des Leptin auf die Knochenformation konnte wiederum durch die systemische Gabe von  $\beta$ -Antisymphathikotonika aufgehoben werden, welche direkt an  $\beta$ -2-Rezeptoren auf Osteoblasten binden (Takeda et al., 2002).

Die nächste, sich stellende Frage ist nun, welche Transmitter des sympathischen Nervensystems die regulierende/regulative Funktion der Signalübermittlung vom Hypothalamus in die Peripherie übernommen haben könnten. Als ein potentieller Kandidat für diese Rolle präsentiert sich der Neurotransmitter  $\alpha$ -CGRP.

#### 3.4. Calcitonin-Gene-Related-Peptide (CGRP)

Humanes alpha-Calcitonin-gene-related-peptide ( $\alpha$ -CGRP) ist ein aus 37 Aminosäuren zusammengesetztes Peptid, Genprodukt des Calc1-Gens, lokalisiert auf dem kurzen Arm des Chromosom 11, auf dem sich ebenfalls die genetischen Informationen für das Hormon Calcitonin befinden.

Es entsteht durch gewebespezifisches, alternatives Spleißen des primären RNS-Transkriptes in bestimmten zentralen und peripheren Neuronen (Amara et al., 1982, Rosenfeld et al., 1983). Das  $\alpha$ -CGRP unterscheidet sich beim Menschen durch drei, bei der Ratte durch nur eine Aminosäuren vom  $\beta$ -CGRP, dem Genprodukt des Calc2-Gens, ebenfalls auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert. Beide CGRP's besitzen eine 20%ige Homologie zum Hormon Calcitonin. Die CGRP's sind Neuropeptide, mit vorwiegendem Vorkommen im Nervensystem. Hier findet man sie beispielsweise in sensorischen, motorischen und autonomen Nerven, sowie im Hypothalamus, Thalamus und Hippocampus. Darüber hinaus findet sich das CGRP in den C-Zellen der Schilddrüse und in den PNE-Zellen der Lunge, wo man es häufig in Kolokalisation mit Calcitonin findet. Im peripheren Nervensystem kann  $\alpha$ -CGRP vor allem in unmyelinisierten C-Fasern und in A $\delta$ -Fasern nachgewiesen werden. Das CGRP ist eines der am weitesten verbreiteten und am häufigsten vorkommenden Peptide des Nervensystems (Ishida-Yamamoto, Tohyama, 1989). Häufig findet man es in Kolokalisation mit anderen Neuropeptiden, wie beispielsweise Substanz P oder VIP (Vasoactive Intestinal Peptide). Diverse Studien liefern Hinweise dafür, dass das CGRP wichtige neuromodulatorische sowie neuroeffektorische Aufgaben im Organismus wahrnimmt.

So sind in der humanen Epidermis CGRP-haltige Nervenfasern gefunden worden, die in direktem Kontakt zu den Langhans-Riesenzellen stehen und scheinbar durch die Freisetzung von CGRP die Antigen-präsentierende Funktion dieser Zellen regulieren (Hosoi et al., 1993). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass mittels elektrischer und chemischer Stimulation des Nervus phrenicus in der Ratte Cal-

cium-abhängig CGRP aus dem neuromuskulären Spalt freigesetzt wird, welches direkt auf die quergestreiften Muskelfasern wirkt (Uchida et al., 1990). Ein weiteres Beispiel für die neurogene Wirkung des CGRP liegt in seiner Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur. So konnte gezeigt werden, dass das CGRP einen rasch wirkenden, potenten Vasodilatator darstellt (Brain et al., 1985, Marshall et al., 1986, Nelson et al., 1990).

Mehrere Studien haben Hinweise auf einen regulatorischen Einfluss des CGRP auf den Knochenstoffwechsel geliefert. So vermag das  $\alpha$ -CGRP, die Bildung von Knochenkolonien in Ratten-Knochenmarkskulturen in vitro zu stimulieren (Bernard und Shih, 1990). Weiterhin ist  $\alpha$ -CGRP in der Lage, die Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in Primärkulturen humaner osteoblastenähnlicher Zellen anzuregen und darüber eine Erhöhung der [H3]Thymidin-Aufnahme zu bewirken (Villa et al., 2000). Ähnliche Beobachtungen wurden von Cornish et al. bei Versuchen mit fetalen Ratten-Osteoblasten beschrieben (1999). Tägliche in vivo-Injektionen von  $\alpha$ -CGRP konnten bei Ratten nachweislich vor durch Ovariectomie induziertem Knochenmasseverlust schützen (Valentijn et al., 1997), und die Überexpression von  $\alpha$ -CGRP bei transgenen Mäusen unter der Kontrolle eines Osteoblasten-spezifischen Promoters führt zu einer Zunahme der Knochendichte (Ballica et al., 1999).

Nach dem chirurgischen Setzen von Knochendefekten konnte das Einwachsen CGRP-haltiger Nervenfasern beobachtet werden, häufig zusammen mit dem Einsprossen neuer Blutgefäße (Aoki et al., 1994), ein Hinweis auf eine mögliche Rolle des CGRP bei der Knochenheilung und Kallusformation. Hukkanen et al. berichteten von ähnlichen Ergebnissen in Frakturheilungs-Studien (1993).

Insbesondere der Nachweis spezifischer Rezeptoren für CGRP auf Osteoblasten bestärkt die Vermutung eines spezifischen Einflusses dieses Neurotransmitters auf den Knochen (Villa et al., 2000).

#### 3.5. CGRP-defiziente Mausmodelle

Bei dem Calc1-defizienten Mausmodell handelt es sich um ein durch genetische Manipulation generiertes Mausmodell, bei dem das Calc1-Gen, welches die genetische Information für die Polypeptide Calcitonin sowie  $\alpha$ -CGRP enthält, deletiert wurde. Ziel war es, die physiologische Funktion von Calcitonin und  $\alpha$ -CGRP innerhalb des Knochenstoffwechsels näher zu untersuchen. Bei der Untersuchung der Mäuse zeigte sich ein Phänotyp, der durch eine Erhöhung der Knochenmasse gekennzeichnet war. Hierbei war die Anzahl der Knochen trabekel erhöht und der Abstand der Trabekel zueinander reduziert (Hoff et al., 2000).

Dieser Phänotyp ist insofern verwunderlich, als bei Fehlen des putativ die Knochenmasse fördernden  $\alpha$ -CGRP, sowie der Deletion des die Knochenresorption inhibierenden Calcitonin ein osteopenischer Knochenphänotyp zu erwarten gewesen wäre. Im Rahmen dieser Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Phänotyp nicht durch Veränderungen der Resorption und Calcium-Homöostase bedingt war, sondern durch eine etwa 2-fache Erhöhung der Knochenformationsrate. Es wurde geschlossen, dass eines dieser Polypeptide einen inhibierenden Effekt auf die knochenbildende Tätigkeit der Osteoblasten ausüben muss.

Eine Klärung der Frage, ob die erhöhte Knochendichte der Calc1-defizienten Mäuse primär auf den Ausfall von Calcitonin oder auf den Ausfall von  $\alpha$ -CGRP zurückzuführen ist, konnte durch konsekutive Untersuchungen an Mäusen erfolgen, in denen durch Einfügen eines Stop-Codons in Exon 5 des Calc1-Gens spezifisch die Produktion von  $\alpha$ -CGRP ausgeschaltet wurde. In diesen Mäusen wurde eine Osteopenie festgestellt, bedingt durch eine erniedrigte Knochenformation. Somit musste geschlossen werden, dass  $\alpha$ -CGRP, zumindest in der Maus ein physiologischer Aktivator der Knochenbildung ist (Schinke et al., 2008).

### 4. Material und Methoden

#### 4.1. Materialien

Der polyklonale Ziege-gegen-Ratte CGRP Antikörper mit Kreuzreaktivität gegen Maus und gerichtet gegen das gesamte CGRP-Molekül sowie gegen das C-terminale Fragment (Aminosäuren 23-37) wurde von der Firma Biotrend (Katalog-Nr: 1720-9007) bezogen.

Der polyklonale Kaninchen-gegen-Rind Neurofilament 200-Antikörper mit breiter Kreuzreaktivität gegen verschiedene andere Spezies (Product No. N4142) wurde von der Firma Sigma bezogen.

Der monoklonale Maus-gegen-Mensch Neurofilament Antikörper mit Kreuzreaktivität gegen Maus, Ratte, Kaninchen wurde von der Firma DAKO, Klon 2F11 (Code Nr: M0762, Lot 089) geliefert.

Die biotinylierten Immunglobuline Schwein-gegen-Kaninchen (Code Nr: E0353) und Kaninchen-gegen-Ziege (Code Nr: E0466), normales Maus-Serum (Code Nr: X0910) und das Peroxidase-konjugierte Streptavidin (Code Nr: P0397) wurden ebenfalls von der Firma Sigma bezogen.

Von DAKO wurde ebenfalls das TRITC-konjugierte Schwein-gegen-Kaninchen Immunglobulin (Code Nr: R0156, Lot 109) bezogen.

Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen Solution (Code Nr: K3467) von der Firma DAKO wurde zur färberischen Darstellung der stattgefundenen Antigen-Antikörperreaktion auf den Präparaten benutzt.

Die übrigen zur Herstellung der entsprechendn Lösungen benötigten Chemikalien wurden alle von den Firmen Sigma, DAKO und Merck bezogen.

#### 4.2. Paraffineinbettung der Knochen

Die für die folgenden Versuche verwendeten Knochen wurden von adulten Wildtyp-Mäusen beider Geschlechter, bezogen von der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, gewonnen.

#### 4. Material und Methoden

---

Darüber hinaus wurden die Knochen von 6 männlichen Calc1-defizienten Mäusen und 6 männlichen Wildtyp-Kontrollmäusen, jeweils 16 Wochen alt, untersucht. Diese stammten aus den Laboratorien von Herrn Prof. Gagel, Houston, Texas, USA und waren bereits in Formalin fixiert versandt worden.

Vor der Präparation wurden die Tiere entsprechend den Tierversuchsbestimmungen durch die Mitarbeiter der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf euthanasiert.

Die präparierten und von Muskulatur befreiten Mäuse-Tibiae und Mäuse-Femora sowie die lumbalen Maus-Wirbelkörper mit der umgebenden autochtonen Rückenmuskulatur wurden zunächst zur Fixierung für 24 Stunden bei 37 °C in 4% Tris (0,05 M, pH 7,5)-gepuffertes Formalin verbracht.

Anschließend erfolgte eine vorsichtige Demineralisierung der Knochen im Wärmeschrank bei 37 °C in 10%iger EDTA-Lösung (pH 7,4), für insgesamt 14 Tage, um durch die Demineralisierung einen mit dem Mikrotom schneidbaren Knochen zu gewinnen ohne jedoch einen Antigenverlust durch eine zu rasche Behandlung in einer zu konzentrierten Lösung zu riskieren.

Nachfolgend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe, (70%, 70%, 80%, 80%, 96%, 96%, 100%, 100%) entwässert, und nach zwei 15-minütigen Bädern in Xylol sowie drei 30-minütigen Bädern in Paraffin in Paraffinblöcke gegossen.

Nach Aushärtung des Paraffins wurden von den so eingebetteten Knochen 3 µm dicke Schnitte am Microtech Rotationsmikrotom (Techno-Med, München, Deutschland) angefertigt.



### 4.3. Entparaffinierung der Paraffinschnitte

Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte durch Bebrütung für 2 Stunden bei 60 °C im Wärmeschrank und anschließender Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe (jeweils 1 Minute) bis zum Aqua dest. nach vorausgegangenem zwei mal zehnmütigem Bad in Xylol.

### 4.4. Silber-Imprägnation von Nerven, Methode nach Linder (1978)

Nach der Entparaffinierung erfolgte der Transfer der Schnitte aus dem Aqua dest. in die von Linder beschriebene Puffer-Stammlösung (0,1 M 2,4,6-Collidine mit Salpetersäure (pH 7,2)) für 10 Minuten bei 60 °C und danach für 15 Minuten bei 60 °C in die Silber-Impregnierungslösung (Silbernitrat, Natriumcyanat und Collidine-Lösung). Als nächstes gelangten die Schnitte für 5-6 Minuten bei 25 °C in die Entwicklungslösung (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, Borax, Hydrochinon, Silbernitrat und Gelatine). Nach mehreren Waschgängen in Aqua dest. wurde schließlich eine erneute Dehydrierung der Schnitte und die Versiegelung der Objektträger mit DPX durchgeführt.

### 4.5. Versilberungsmethode nach Bodian

Nach der Entparaffinierung erfolgte der Transfer der Schnitte aus dem Aqua dest. für 24 Stunden in eine 1%ige Albuminosesilberlösung (3 g Albuminosesilber in 300 ml Aqua dest bei 37 °C im Wärmeschrank lösen und 15 g Kupferblech in die Lösung legen) bei 37 °C im Wärmeschrank. Anschließend wurden die Schnitte im Aqua dest. gewässert und dann für 10 Minuten in die Reduktionslösung, bestehend aus 3 g Hydrochinon, 15 ml Formalin (40%) und 300 ml Aqua dest) verbracht. Anschließend erneute Wässerung der Schnitte in Aqua dest. für etwa 4 Minuten (dabei 3-4 maliger Wechsel der Flüssigkeit).

Nach dem Wässern Einlegen der Schnitte mindestens 2 bis maximal 10 Minuten in eine 1%ige Goldchloridlösung, welche mit 3 Tropfen Eisessig auf 100 ml Lösung versetzt wurde. Erneutes Wässern mit Aqua dest. (3x 4 Minuten) und Verbringen der

Schnitte in eine 1%ige Oxalsäurelösung, bis die Schnitte sich rötlich bis bräunlich färben. Wässern in Aqua dest. für 3 x 4 Minuten und Fixieren (5 bis 10 Minuten) in Fixiernatron (5%), hergestellt aus 12,5 g Natriumthiosulfat in 250 ml Aqua dest.. Nach mehreren Waschgängen in Aqua dest. erfolgte schließlich eine erneute Dehydrierung der Schnitte und die Versiegelung der Objektträger mit DPX.

### 4.6. Immunhistologie nach der Streptavidin-Biotin-Methode

Die Darstellung der Nervenfasern erfolgte mittels der indirekten Zwei-Schritt-Methode. Hierbei bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das darzustellende Antigen. Anschließend wird ein weiterer, gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichteter, enzymaktivierter, sogenannter Zweitantikörper aufgetragen. Danach erfolgte die Auftragung des Chromogens, mit dessen Hilfe über eine Substrat-Chromogenreaktion die mit dem Primärantikörper markierten Strukturen sichtbar gemacht werden können

Der Entparaffinierung, wie unter 4.3. beschrieben, folgte die Antigendemaskierung mittels Inkubation in der Mikrowelle im Citratpufferbad, 10 mM, pH 6,0, ( 0,1 M Citronensäure und 0,1 M Natrium-Citrat im Verhältnis 9:41 auf 500 ml aufgefüllt) für 5 Minuten bei 240 Watt und anschließend für 10 Minuten bei 80 Watt. Nach Abkühlen der Schnitte erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase durch Inkubation mit Wasserstoffperoxid (3%) für 5 Minuten. Alle Schritte waren von Spülgängen in einer mit 1% BSA und 2% Magermilchpulver versetzten PBS-Lösung (0,01 M, pH 7,5) zur Blockierung begleitet.

Als Basis für alle Verdünnungen, mit dem Ansatz für DAB als einzige Ausnahme, wurde eine mit 1% BSA und 2% Magermilchpulver versetzte PBS-Lösung (0,01 M, pH 7,5) verwendet.

Vor der Färbung mit den Antikörpern wurde eine zusätzliche Vorblockierung mit PBS-gepuffertem Kälberserum (im Verhältnis 1:40) für 45 Minuten durchgeführt, um eine unspezifische Färbung zu verhindern. Anschließend erfolgte die 60-minütige Inkubation mit dem ersten Antikörper (=Primärantikörper) (polyklonale Ziege-gegen-Ratte CGRP Antikörper, Biotrend, respektive monoklonale Maus-gegen-Mensch Neurofilament Antikörper, DAKO) in der Verdünnung 1:200.

Nach den obligatorischen Spülgängen folgte darauf eine 30-minütige Inkubation mit dem zweiten Antikörper (biotinylierte Immunglobuline Kaninchen-gegen-Ziege respektive Schwein-gegen-Kaninchen) in der Verdünnung 1:200 zusammen mit Maus-Serum in der Verdünnung 1:40.

Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation in Streptavidin HRP (Horseradish-peroxidase) (DAKO) in der Verdünnung 1:200, anschließend die Entwicklung mit DAB-Chromogen (6-7 Min).

Die Gegenfärbung der Schnitte wurde mit Mayer's Hämalaun (in der Verdünnung 1:10) durchgeführt. Einige Schnitte wurden in Abwandlung statt mit Mayer's Hämalaun mit Lichtgrün in der Verdünnung von 0,1 % gegengefärbt. Als letzten und abschließenden Schritt erfolgte die Dehydrierung der Schnitte und die Versiegelung der Objektträger mit DPX.

### 4.7. Immunfluoreszenz

Als alternative Nachweismethode wurde die Immunfluoreszenz (indirekte Zwei-Schritt-Methode) gewählt. Der Zweitantikörper ist bei dieser Methode fluoreszenzmarkiert. Die mit dem Primärantikörper markierten Strukturen können sodann mittels eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden.

Der Entparaffinierung, wie unter 4.3. beschrieben, folgte die Antigendemaskierung mittels Inkubation in der Mikrowelle im Citratpufferbad, 10 mM, pH 6,0, ( 0,1 M Citronensäure und 0,1 M Natrium-Citrat im Verhältnis 9:41 auf 500 ml aufgefüllt) für 5 Minuten bei 240 Watt und anschließend für 10 Minuten bei 80 Watt. Nach Abkühlen

#### 4. Material und Methoden

---

der Schnitte Spülung 2 x 5 Minuten in PBS und anschließende Blockierung der endogenen Peroxidase durch Inkubation für 1 Stunde mit einer Blockierlösung, bestehend aus PBS mit 0,1% BSA, 5% NGS und 0,05% Saponin.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem mit der Blockierlösung verdünnten Primärantikörper (polyklonaler Kaninchen-gegen-Rind Neurofilament 200-Antikörper, Sigma) für 2 Stunden. Spülung der Schnitte für 3 x 15 Minuten in einer Lösung aus PBS mit 0,1 % BSA und 0,05% Saponin. Inkubation für 1 Stunde mit dem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper (TRITC-konjugiertes Schwein-gegen-Kaninchen Immunglobulin, DAKO).

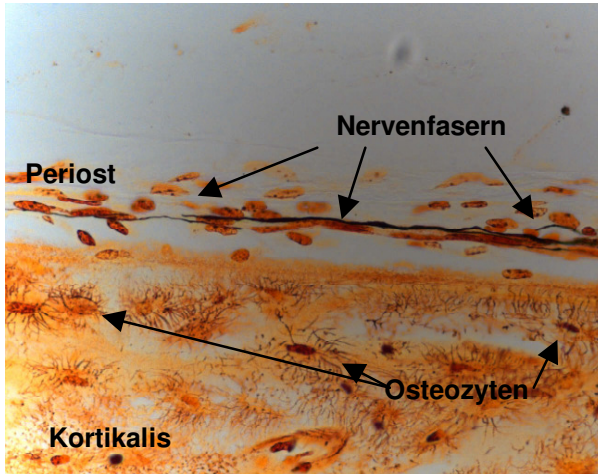
Erneutes Spülen für 3 x 15 Minuten, wie nach der ersten Inkubation. Eindeckeln der Schnitte mit Fluorsave.

### 5. Ergebnisse

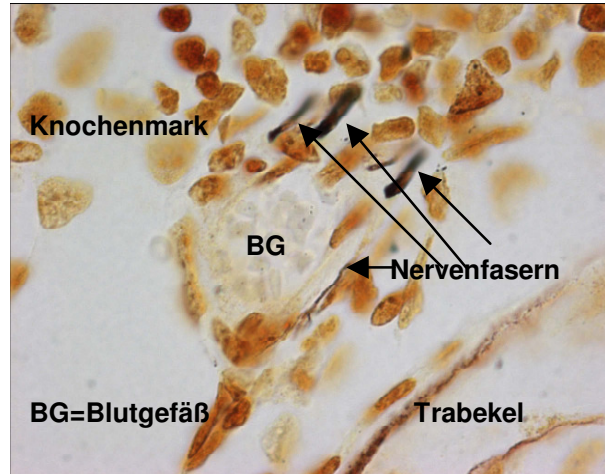
#### 5.1. Darstellung von Nervenfasern mittels der Versilberungsmethoden

Die Entdeckung der starken Einflussnahme des Hormons Leptin auf den Knochenstoffwechsel im Zusammenspiel mit der Tatsache, dass die Wirkung des Hormons nicht auf auto-/parakrinem Wege, sondern vielmehr über das sympathische Nervensystem vermittelt wurde, wirft die Frage nach dem Vorhandensein und der Verteilung von Nervenfasern im Knochen auf.

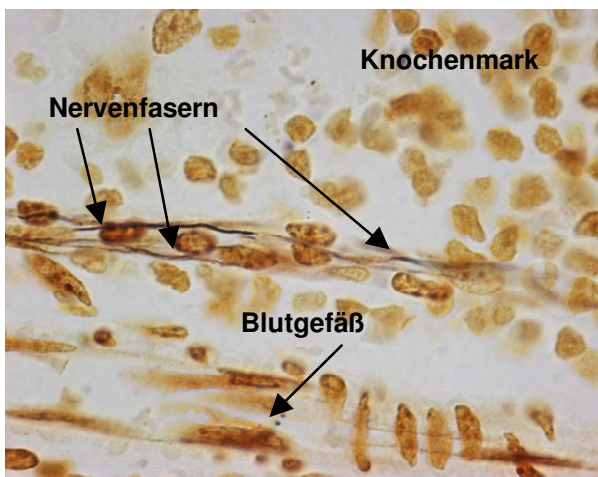
In der vorliegenden Arbeit erfolgte zum Zwecke der Nervenfaserdarstellung in Mäuseknochen zunächst die Darstellung der Nervenfasern mit der Versilberungsmethode. Zur unspezifischen Darstellung von Nervengewebe wurden zwei verschiedene Versilberungsmethoden, die Methode nach Bodian und die nach Linder (Linder, JE, 1978), angewendet. Mit diesen Methoden konnten die im und um den Knochen befindlichen Nervenfasern sehr gut dargestellt werden. Dabei kamen die Nervenfasern in der Färbung nach Linder schwarz zur Darstellung. Im Periost fanden sich zahlreiche, netzförmig verzweigte Nervenfasern (Abbildung 1a.), welche teilweise auch in den Knochen zogen. Weitere Nervenfasern fanden sich in der Gefäßwand von und zudem auch entlang von im Markraum befindlichen Blutgefäßen entlang verlaufend (Abbildung 1b.). Einzelne Nervenfasern konnten auch im Markraum in der Nähe von Knochentrabekeln bis an das Endost derselben (Abbildung 1d.) sowie auch als isoliert im Markraum verlaufende Fasern oder auch Bündel (Abbildung 1c.) fernab von Blutgefäßen dargestellt werden.



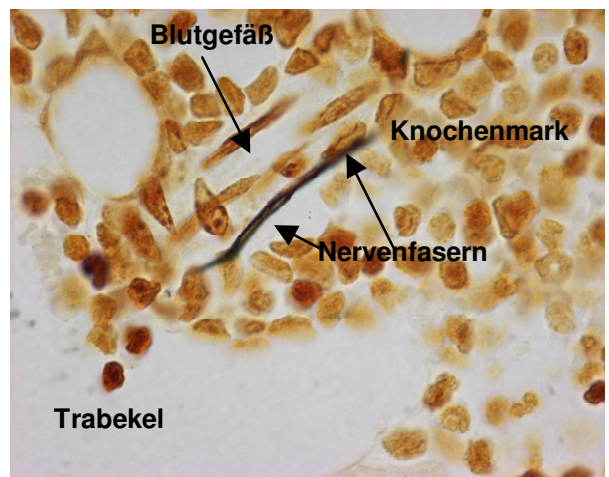
1a



1b



1c



1d

**Abb. 1a. bis 1d.: Nervendarstellung mittels Versilberung nach Linder, Wildtyp-Mäusefemora**

1a.: Periost mit angrenzender Kortikalis. Im Periost verlaufen zahlreiche Nervenfasern (Vergrößerung 1:100).

1b.: Nervenfasern entlang eines Blutgefäßes (BG) im Markraum in der Nähe eines Knochen trabekels (nicht angefärbt). Im Lumen des Blutgefäßes finden sich Erythrozyten (Vergrößerung 1:400).

1c.: Nervenfasern einzeln im Markraum, darunter zu sehen ein Blutgefäß (Vergrößerung 1:1000).

1d.: Einzelne Nervenfasern im Markraum in Richtung eines Knochen trabekels (nicht angefärbt) ziehend, darüber ein Blutgefäß im Längsschnitt (Vergrößerung 1:400).

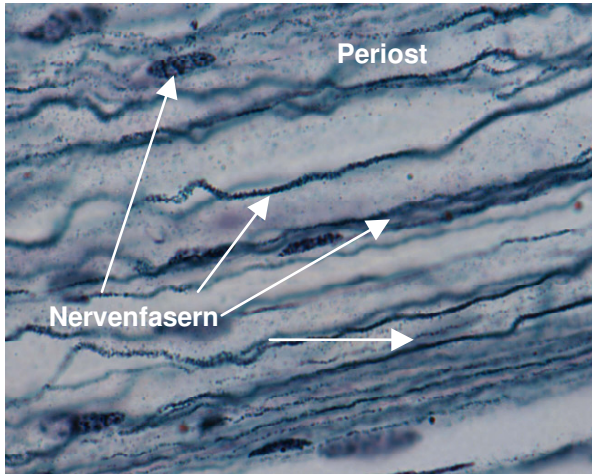
## 5. Ergebnisse

---

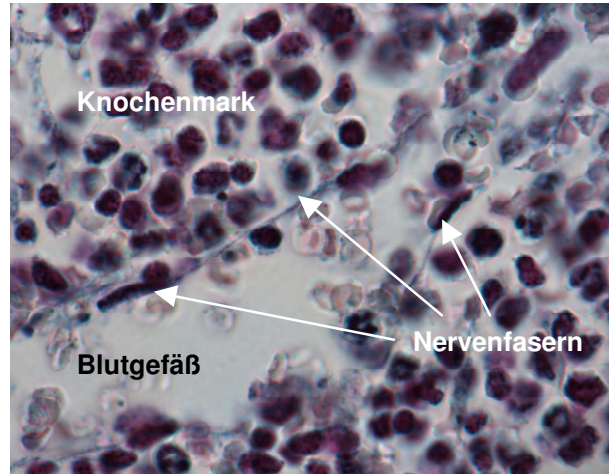
Auch mittels der Versilberungsmethode nach Bodian kamen multiple kreuz und quer verlaufende Nervenfasern im Periost (Abbildung 2a.) zur Darstellung. Im Markraum der Knochen fanden sich ebenfalls einzelne und gebündelt durch den Markraum ziehende Nervenfasern (Abbildung 2d.), von denen viele auch bis an das Endost der Knochenbälkchen (Knochentrabekel) heranreichten (Abbildung 2c.). Weitere Nerven zeigten sich in Blutgefäßwänden und entlang von Gefäßen verlaufend (Abbildung 2b.).

Durch die Versilberungsmethode nach Bodian wurden die Nervenfasern blauschwarz angefärbt, wobei die Fasern im Vergleich zu der Färbemethode nach Linder eher körnig zur Darstellung kamen.

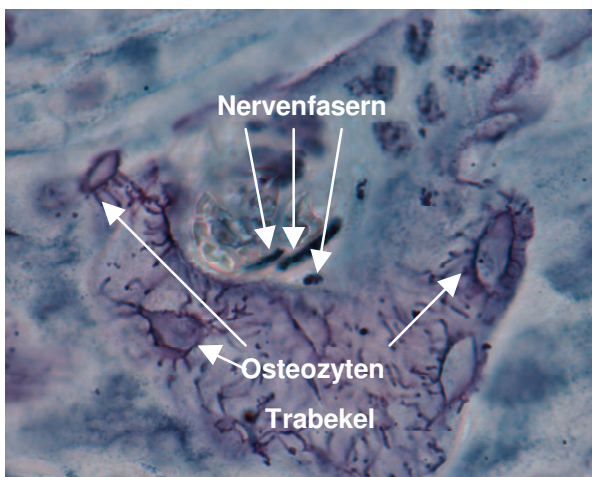
## 5. Ergebnisse



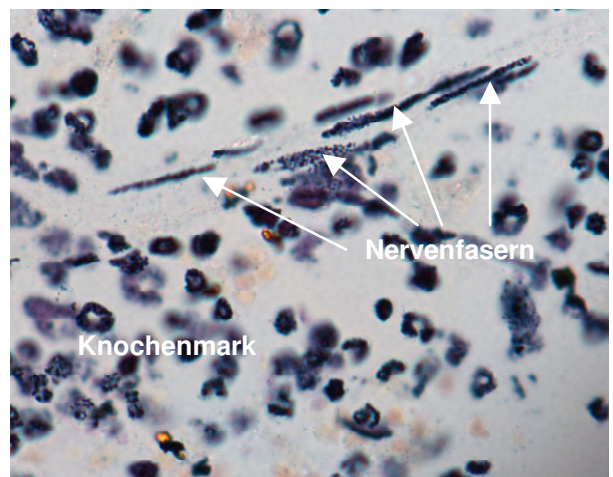
2a



2b



2c



2d

**Abb. 2a. bis 2d.: Nervendarstellung mittels Versilberung nach Bodian, Wildtyp-Mäusewirbelkörper**

2a.: Periost mit darin parallel zueinander verlaufenden, multiplen Nervenfasern, hauptsächlich längsverlaufend, teilweise im Querschnitt getroffen, (Vergrößerung 1:100).

2b.: Nerven entlang eines Markraumgefäßes. Im Gefäß finden sich Erythrozyten. Die feinen Nervenfasern flankieren die Gefäßwand (Vergrößerung 1:400).

2c.: Nervenfasern direkt an einem Knochen trabekel anliegend. Im Trabekel finden sich einige violett angefärbte Osteozyten (Vergrößerung 1:400).

2d.: Mehrere längs getroffene, parallel verlaufende Nervenfasern im Markraum (Vergrößerung 1:400).

Beide Methoden erbrachten gleichwertig zufriedenstellende, spezifische Darstellungen der Nervenfasern, wobei die Methode nach Linder aufgrund der gelbbraunen



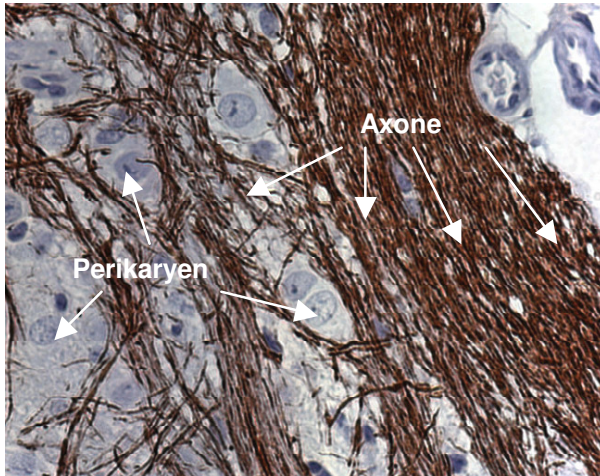
Anfärbung der nicht nervalen Strukturen im Gegensatz zu der Versilberungsmethode nach Bodian, bei der diese Strukturen alle in Blautönen gefärbt wurden, einen wesentlich deutlicheren Kontrast und damit eine bessere Abgrenzbarkeit der Nervenfasern zur Umgebung bietet. Ein Nachteil beider preisgünstiger Methoden ist jedoch die mangelnde Möglichkeit der Spezifizierung der Nervenfasern hinsichtlich der in ihnen enthaltenen Neurotransmitter, so dass angesichts der Vielfalt der heutzutage erhältlichen Antikörper und der mittlerweile sehr gut etablierten immunhistochemischen Färbemethoden diese den Versilberungsmethoden vorzuziehen sind.

### 5.2. Immunhistochemische Darstellung von Nervenfasern

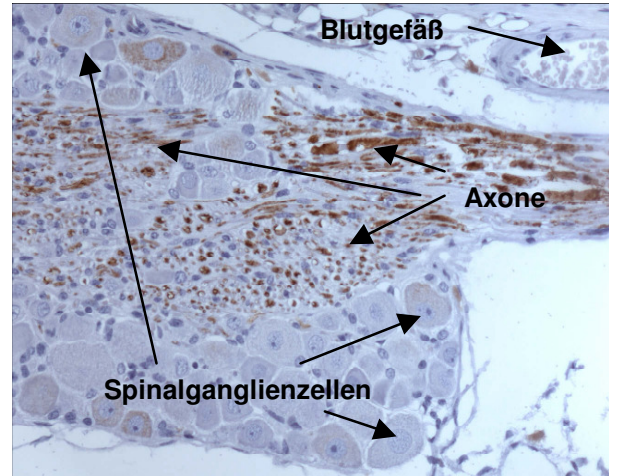
Dank der heutzutage möglichen spezifischen Darstellung bestimmter Nervenfasern wurden ergänzend immunhistologische Methoden zur Nervenfaserdarstellung angewendet. Bei diesen Methoden besteht die Möglichkeit der spezifischen Darstellung von bestimmten Neuromediatoren mit den jeweiligen, gegen sie gerichteten Antikörpern.

Mit Hilfe des monoklonalen Maus-gegen-Mensch Neurofilament Antikörpers, mit Kreuzreaktivität gegen Maus, welcher gegen die phosphorylierte Form der 70 kDa-Komponente der drei Polypeptid-Hauptuntergruppen, die generell in Neurofilamenten vorliegen, gerichtet ist, konnte eine Darstellung von peripheren Nerven erreicht werden.

Die Abbildungen 3a. und 3b. zeigen die Positivkontrollen der Darstellung der Nervenfasern mit dem Antikörper gegen Neurofilament mittels der Streptavidin-Biotin-Methode (indirekte Zwei-Schritt-Methode). Diese Positivkontrollen wurden an Paraffinschnitten von Wildtyp-Maus-Großhirnen und Spinalganglien durchgeführt. Hierbei kamen die Nervenfasern dunkelbraun gefärbt zur Darstellung. Die Gegenfärbung des übrigen Gewebes erfolgte mit Mayer's Hämalaun. Die damit dargestellten Strukturen färbten sich blau an.



3a

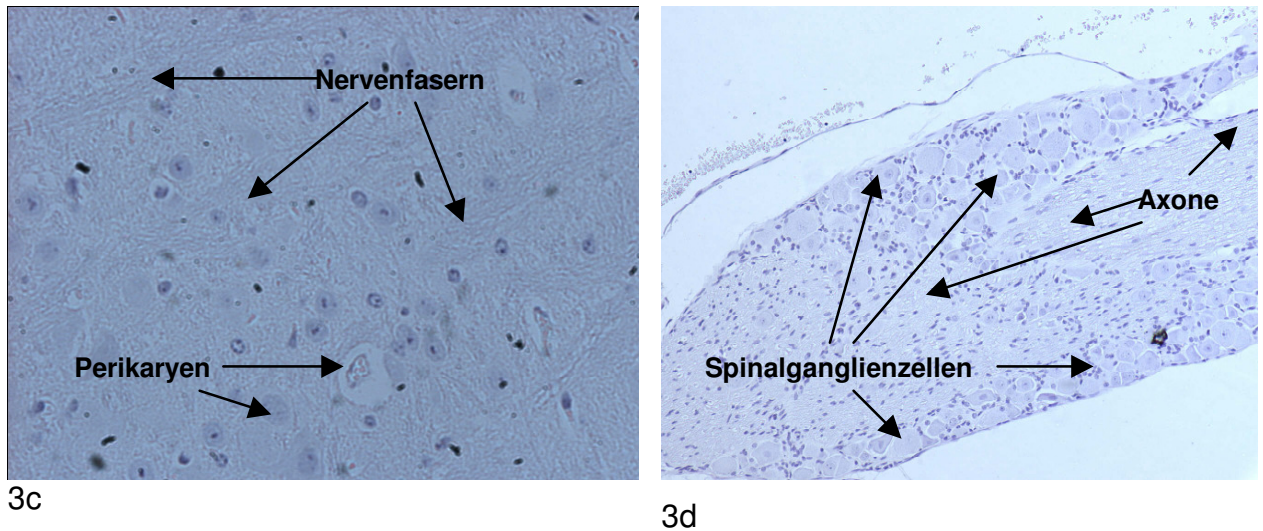


3b

**Abb. 3a. und 3b. Positivkontrollen, Nervenfaserdarstellung mit Anti-Neurofilament-Antikörper, Wildtyp-Mäuse**

3a.: Hirnschubstanz (Großhirn) mit netzförmig verlaufenden Axonen (braun) und dazwischen gelegenen Perikaryen (blau angefärbt mit Zellkernen in einem dunkleren blau angefärbt) (Vergrößerung 1:400),  
3b.: Spinalganglion mit längs und quer getroffenen, braun angefärbten Axonen und blau angefärbten Spinalganglienzellen (Vergrößerung 1:100).

Bei den Negativkontrollen, ebenfalls durchgeführt an Wildtyp-Maus-Großhirnen und an Wildtyp-Maus-Spinalganglien, erfolgte eine selektive Inkubation nach dem Färbeprotokoll für die Streptavidin-Biotin-Methode ohne die Zugabe des Primärantikörpers. So konnte eine Verfälschung des Untersuchungsergebnisses durch eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers an Strukturen im zu untersuchenden Gewebe ausgeschlossen, beziehungsweise bei positivem Färbeargebnis, nachgewiesen werden. Die hier aufgeführten Positiv- und Negativkontrollen zeigen eine spezifische Färbung von Nervenfasern durch den monoklonalen Maus-gegen-Mensch Neurofilament Antikörper.



**Abb. 3c. und 3d. Negativkontrollen der Nervenfaserdarstellung mit Anti-Neurofilament-Antikörper, Wildtyp-Mäuse**

3c.: Hirnsubstanz, Großhirn; Nervenfasern und Perikaryen fanden sich durch die Gegenfärbung blau angefärbt auf den Schnitten. Keine spezifische Anfärbung (braun) durch die Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (Vergrößerung 1:400),

3d.: Spinalganglion; rechts im Bild die gebündelten Nervenfasern, links im Bild die Spinalganglienzellen. Auch hier keine spezifische Anfärbung der neuralen Strukturen (Vergrößerung 1:100).

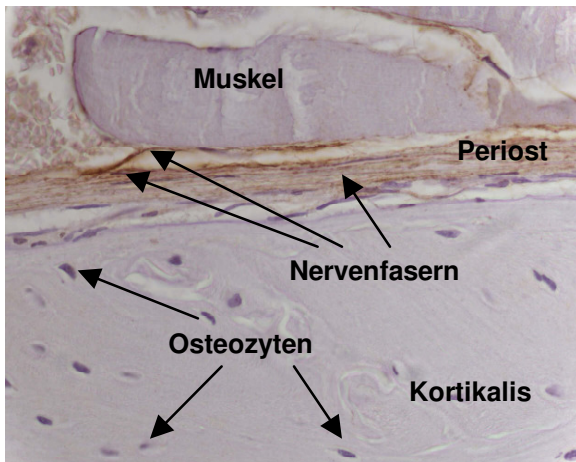
Nachdem durch die erfolgreichen Positiv- und Negativkontrollen die Spezifität des Primärantikörpers nachgewiesen worden war, erfolgte im nächsten Schritt die immunhistochemische Darstellung von Nervenfasern im Knochen. Die Färbungen wurden an Paraffinschnitten entkalkter Wildtyp-Maus-Knochen durchgeführt. Bei den dabei verwendeten Knochen handelte es sich um in EDTA entkalkte Lendenwirbelkörper, Tibiae und Femora. Es fanden sich Nervenfasern in langen Röhrenknochen der Wildtyp-Mäuse, die, in mehreren Schichten parallel neben und übereinander verlaufend das Periost durchzogen und sowohl der Kortikalis des Knochens als auch der an den Knochen grenzenden Muskulatur eng anlagen. Weitere Nervenfasern fanden sich, entsprechend den Ergebnissen der Färbungen mittels der Versilberungsmethoden, auch in Blutgefäßnähe, innerhalb von Blutgefäßwänden und als allein im Markraum verlaufende Fasern. Die Nervenfasern aus dem Markraum zogen

## 5. Ergebnisse

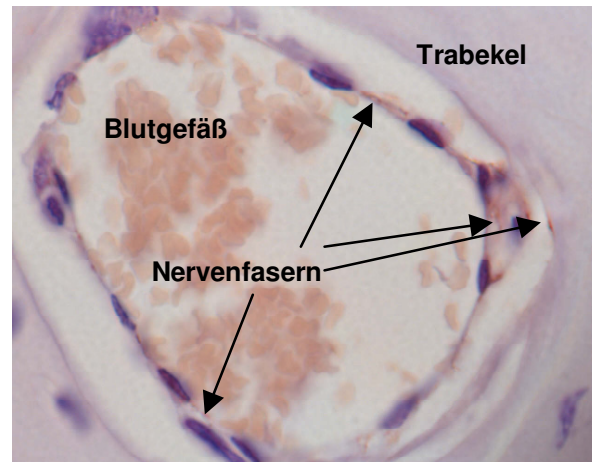
---

teilweise zum Endost der Knochen trabekel. Teilweise verliefen die Nervenfasern dann über eine längere Strecke am Endost entlang (Abbildungen 4a. bis 4d.).

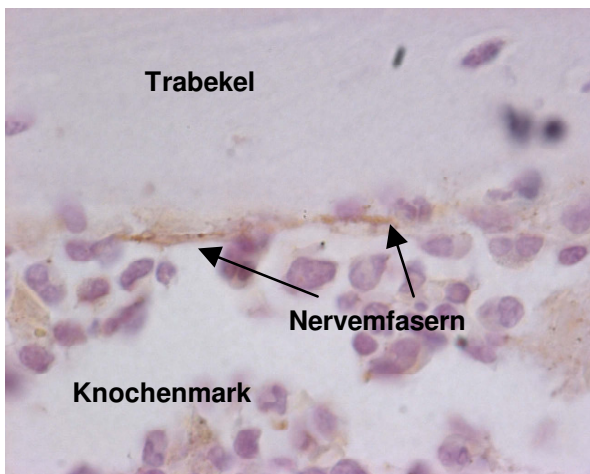
## 5. Ergebnisse



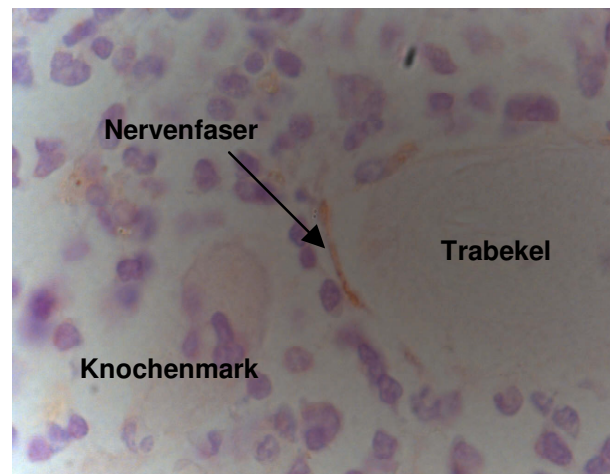
4a



4b



4c



4d

**Abb. 4a. bis d.: Nervenfaserdarstellung mit Anti-Neurofilament-Antikörper, Wildtyp-Mäuse**

4a.: Periost mit längs getroffenen, parallel zueinander verlaufenden Nervenfasern, direkt der Kortikalis und der angrenzenden Muskulatur anliegend (Vergr. 1:400), 4b.: Havers'scher Kanal mit einem zentralen Blutgefäß. Die Gefäßwand begleitend und in ihr verlaufend finden sich braun angefärbte Nervenfasern. Im Gefäßlumen zahlreiche Erythrozyten (Vergr. 1:400), 4c.: Knochentrabekel im Markraum. Direkt am Endost des Trabekels finden sich diesem eng anliegend Nervenfasern (braun) (Vergr. 1:400), 4d.: Knochentrabekel im Markraum; direkt zum Endost des Trabekels ziehend eine Nervenfasern (braun) (Vergr. 1:200).

### 5.3. Darstellung von Nervenfasern mittels der indirekten Immunfluoreszenz

Eine weitere sehr effektive Methode zur Darstellung von Nervenfasern ist die Immunfluoreszenz, benannt nach dem fluoreszierenden Mineral Fluorit. Hierbei binden spezifische, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper an das Fc-Fragment des Primärantikörpers, der wiederum an das darzustellende Antigen im zu untersuchenden Gewebe gebunden ist.

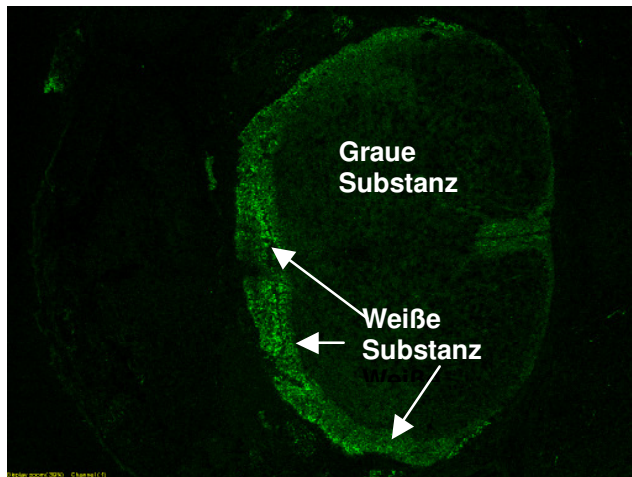
Als Fluoreszenz bezeichnet man das optische Phänomen bestimmter Substanzen, bei elektromagnetischer Bestrahlung ein Photon zu absorbieren und dadurch kurzzeitig im angeregten Zustand vorzuliegen. Als unmittelbare Folge der Lichtabsorption wird ein Photon niedriger Energie wieder emittiert; das ausgesandte Licht hat damit eine andere, größere Wellenlänge als das aufgenommene.

In diesem Fall wird die sekundäre Fluoreszenz ausgenutzt. Diese ist definiert als das Leuchten einer mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelten Struktur oder Substanz.

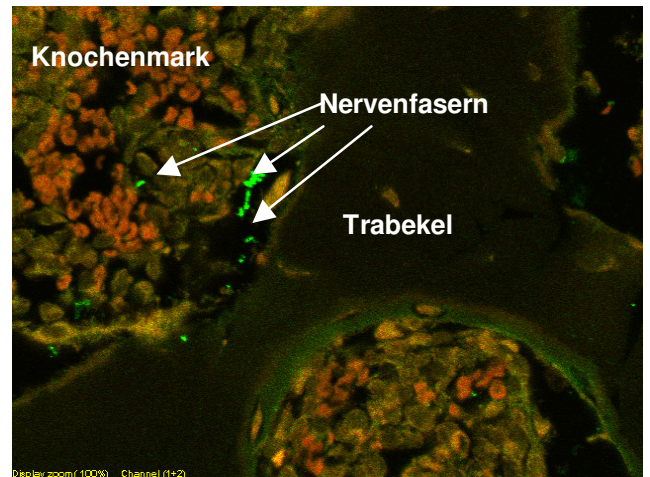
Die Abbildungen 5a. bis 5d. zeigen die mit einem Primärantikörper gegen Neurofilament und in einem zweiten Schritt immunfluoreszenz-markierten Nervenfasern (grün).

Auch diese immunhistologische Färbemethode bestätigt erneut das Vorhandensein von Nervenfasern, welche in der Nähe und entlang von Knochentrabekeln verlaufen. Andere Nervenfasern fanden sich auch in der Darstellung mittels dieser Methode in Gefäßnähe, frei in der Markhöhle verlaufend sowie von dieser aus von metaphysär her in den knorpeligen Anteil der Epiphyse ziehend.

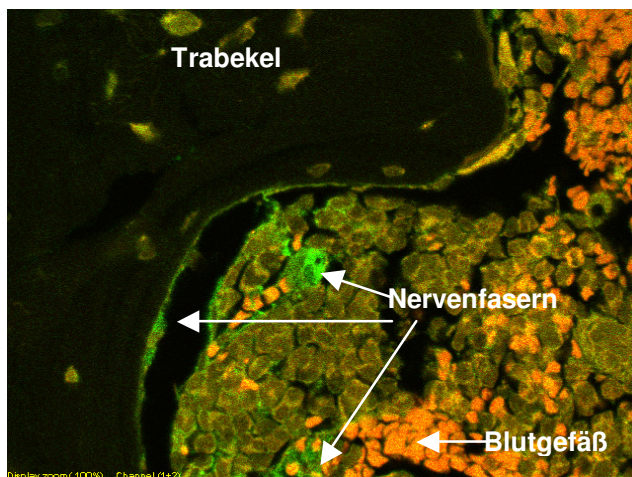
## 5. Ergebnisse



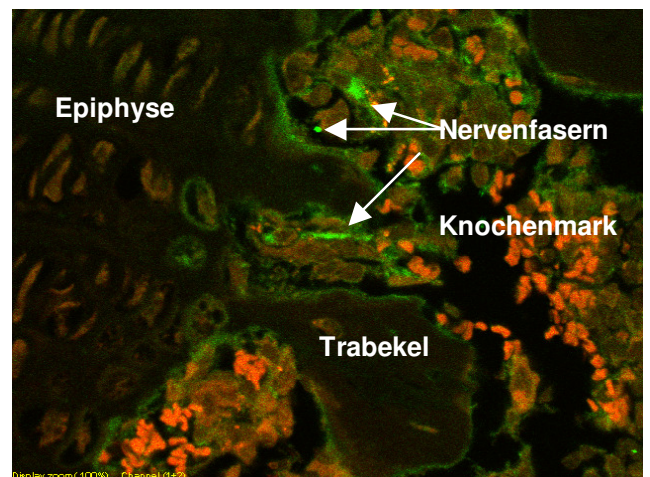
5a



5b



5c



5d

**Abb. 5a. bis 5d.: Nervendarstellung (grün) mittels Immunfluoreszenz, TRITC-konjugierte Antikörper gegen Neurofilament, Wildtyp-Mäuse**

5a.: Positivkontrolle, Querschnitt durch das Rückenmark; randständig die weiße Substanz mit den Axonen der auf- und absteigenden Bahnen (grün), zentral die graue Substanz mit den Perikaryen der Nervenzellen (hellgrün) (Vergrößerung 1:100). 5b.: An das Endost der Trabekel sowie im Knochenmark verlaufende Nervenfasern (grün), rot dargestellt die Erythrozyten, gelb angefärbt Zellen und Bindegewebe (Vergrößerung 1:400). 5c.: Nervenfasern (grün) direkt am Endost eines Knochentrabekels und Nervenfasern in Gefäßnähe (Erythrozyten rot angefärbt) sowie isoliert im Knochenmark verlaufend (Vergrößerung 1:400).

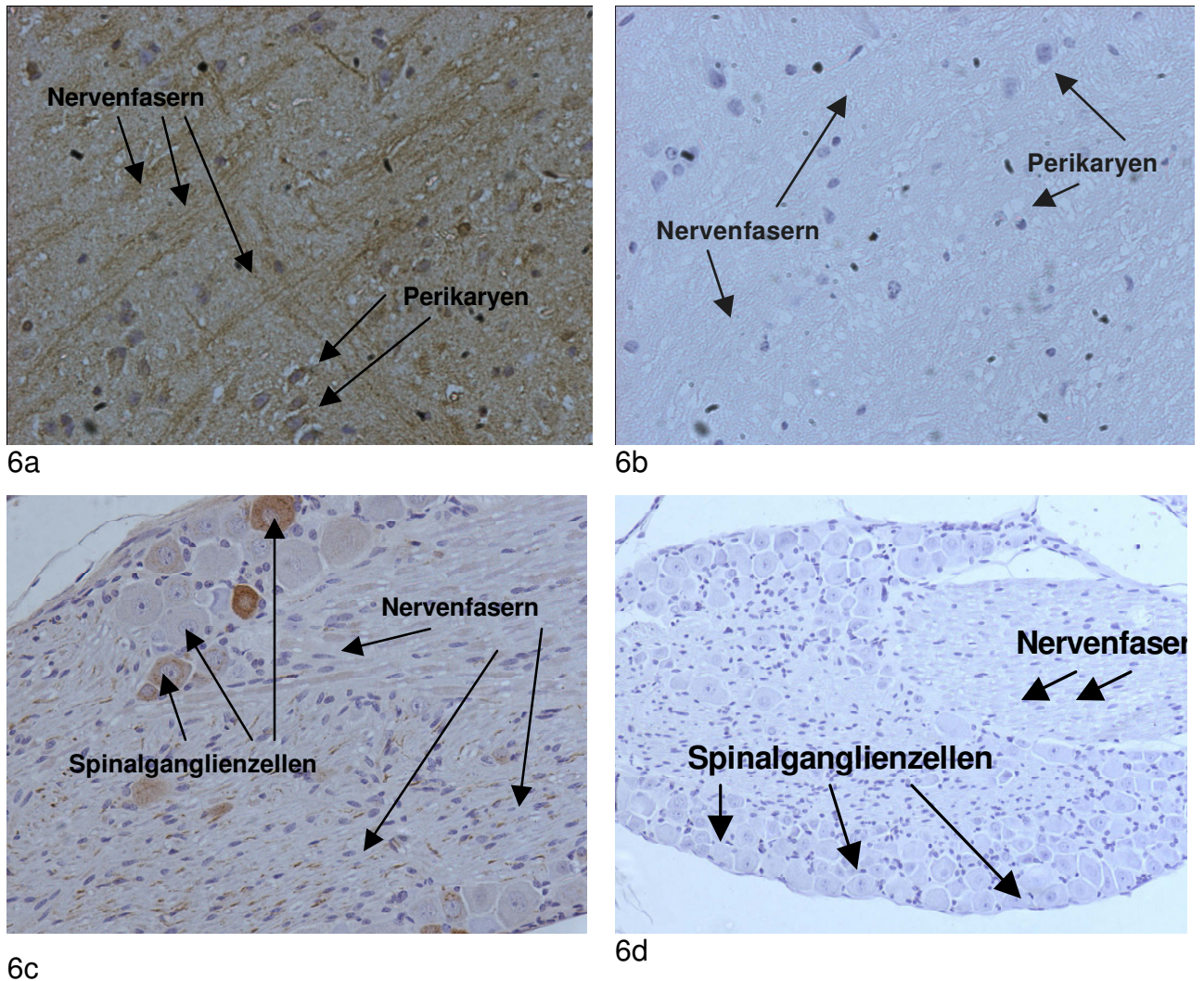
5d.: Nervenfasern, von metaphysär her aus der Markhöhle zur Epiphyse ziehend sowie isoliert im Markraum verlaufend (Vergrößerung 1:400)

### 5.4. CGRP-positive Nervenfasern im Knochen

Mehrere Studien, nahezu alle durchgeführt an Ratten, beschrieben einen möglichen Einfluss des Neurotransmitters CGRP auf den Knochenstoffwechsel, so dass unser Interesse an den CGRP-positiven Nervenfasern im Knochen von Mäusen geweckt wurde.

Um zum einen zu klären, ob sich CGRP-haltige Nervenfasern im Knochen befinden, und um zum anderen bei deren Vorhandensein ihre Verteilung im Knochen zu untersuchen, wurde mittels der Streptavidin-Biotin-Methode eine immunhistochemische Färbung der dieses Neuropeptid enthaltenden Neurone mit einem gegen das gesamte Molekül und das C-terminale Fragment gerichteten Primärantikörper durchgeführt. Unten aufgeführt sind zunächst die Positiv- (Abbildungen 6a. und 6c.) und Negativkontrollen (Abbildungen 6b. und 6d.), durchgeführt an in Paraffin eingebetteten Großhirnen und Spinalganglien von adulten Wildtyp-Mäusen.





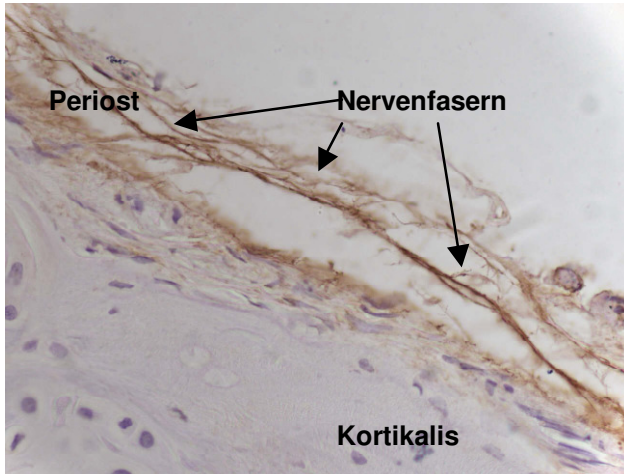
**Abb. 6. bis 6d.: Positiv- und Negativkontrollen der immunhistochemischen Darstellung von Nervenfasern mit Antikörper gegen CGRP, Wildtyp-Mäuse.**

6a.: Positivkontrolle, weiße Substanz, Großhirn, mit braun angefärbten Nervenfasern und blau dargestellten Perikaryen (Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun) (Vergrößerung 1:400). 6b.: Negativkontrolle, weiße Substanz, Großhirn, Nervenfasern und Perikaryen wurden nicht mit dem CGRP-Primärantikörper inkubiert. Es fand sich dementsprechend keine unspezifische Färbung (braun) durch die Streptavidin-HRP (Vergrößerung 1:400). 6c.: Positivkontrolle Spinalganglion, CGRP-haltige Nervenfasern und Perikaryen stellten sich braun angefärbt dar (Vergrößerung 1:200). 6d.: Negativkontrolle Spinalganglion, Inkubation ohne den Primärantikörper. Entsprechend keine Anfärbung (braun) der CGRP-haltigen Strukturen (Vergrößerung 1:100).

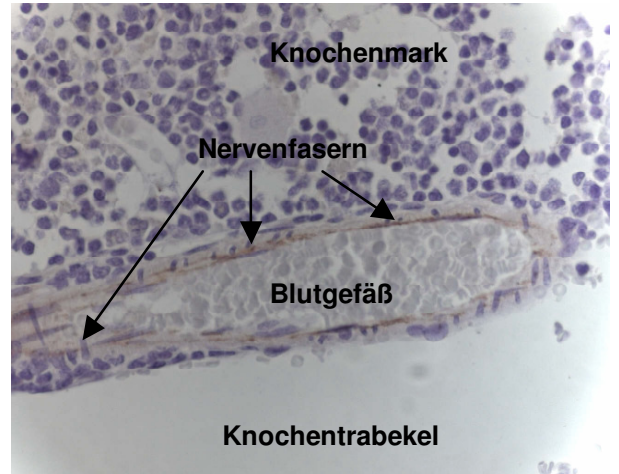
## 5. Ergebnisse

---

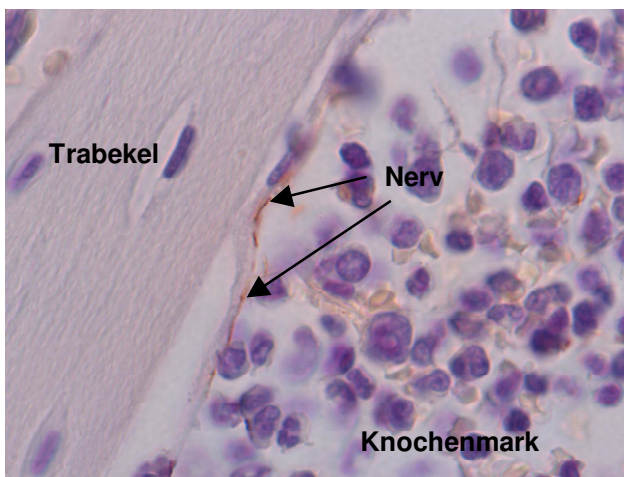
In den Untersuchungen an paraffineingebetteten Wirbelkörpern und langen Röhrenknochen adulter Wildtyp-Mäuse konnten CGRP-positive Nervenfasern im Periost (Abbildung 7a.) und in den Knochen dieser Mäuse nachgewiesen werden. Im Periost verliefen diese Fasern in parallel zueinander angeordneten Bahnen der Kortikalis anliegend und strahlten teilweise sogar in diese ein. Es fanden sich CGRP-positive Nervenfasern gehäuft in direkter Umgebung von Blutgefäßen, teilweise in der Blutgefäßwand verlaufend. Andere Fasern fanden sich um im Markraum und durch die Kortikalis verlaufende Blutgefäße geschlungen oder aber isoliert als einzelne Fasern im Markraum verlaufend. Einige dieser Fasern zogen zum Endost von Knochen trabekeln und verliefen dann über längere Strecken entlang von diesem. (Abbildungen 7b. bis 7d.).



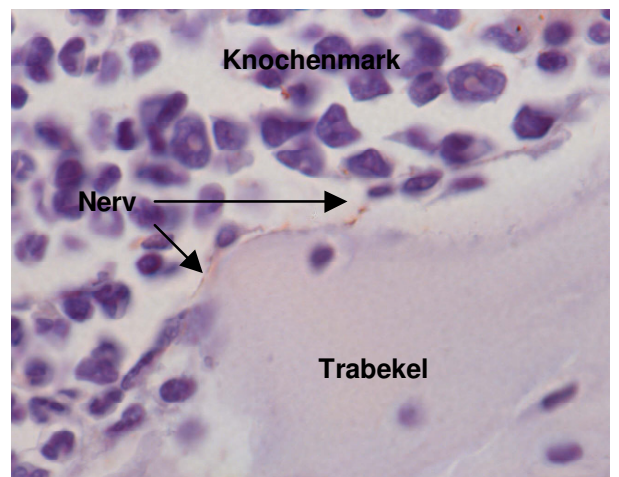
7a



7b



7c



7d

**Abb. 7a bis 7d, CGRP-positive Nervenfasern, Femora von Wildtypmäusen**

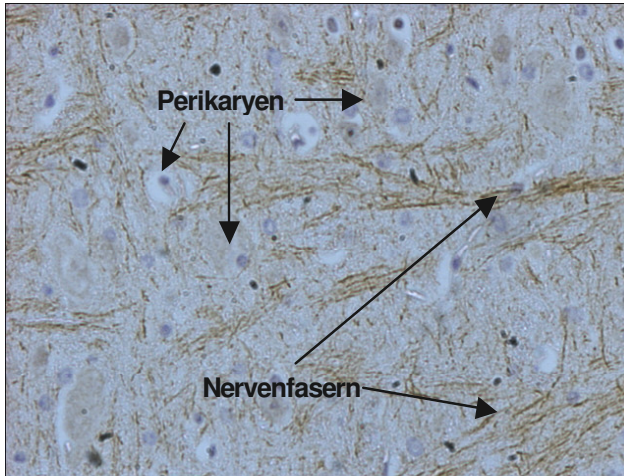
7a.: Netzförmig verteilte, hauptsächlich jedoch parallel zueinander verlaufende, längs getroffene Nervenfasern im Periost (braun) (Vergrößerung 1:400),  
7b.: Nervenfasern in der Wand eines Blutgefäßes im Markraum, das Gefäßlumen ist mit Erythrozyten ausgefüllt (Vergrößerung 1:400).  
7c. und 7d.: Nervenfasern im Markraum (braun), direkt dem Endost von Knochentrabekeln anliegend, entlang dem Trabekel verlaufend (Vergrößerung 1:400).

### 5.5. Calc1-defiziente Mäuse

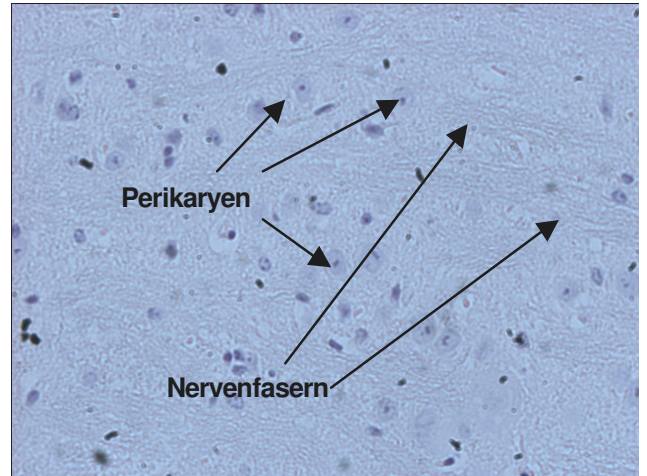
Angesichts der Arbeit in unserer Arbeitsgruppe an Calc1-defizienten-Mäusen, erfolgte ebenfalls eine immunhistochemische Darstellung der Nerven in den Knochen dieser Mäuse. Dieses Mausmodell ist gekennzeichnet durch das Fehlen von sowohl Calcitonin als auch  $\alpha$ -CGRP. Zusätzlich weisen diese Mäuse eine erhöhte Knochenmineraldichte auf. Bei der Anfärbung der Knochen dieser Mäuse zeigte sich, dass der verwendete Antikörper, gerichtet gegen das gesamte CGRP-Molekül und auch gegen das C-terminale Ende des CGRP-Moleküls, auch das  $\beta$ -CGRP nachweist, welches ebenfalls im Knochen vorkommt.

Die Abbildung 8a. zeigt die regelrechte Negativkontrolle. Hierbei kommen nach Inkubation der Paraffinschnitte mit dem Sekundärantikörper unter Auslassung des Primäreantikörpers und entsprechender nachfolgender Inkubation mit Streptavidin-HRP und Entwicklung mit DAB (siehe Protokoll zur immunhistochemischen Färbung mittels der Streptavidin-biotin-Methode) erwartungsgemäß keine Nervenfasern, welche CGRP enthalten könnten, zur Darstellung.

Die Positivkontrolle, zu sehen in der Abbildung 8b., also die Inkubation der Paraffinschnitte mit dem Primär- und mit dem Sekundärantikörper zeigt jedoch eine eindeutige Braunfärbung von Fasern. Da bei diesen Mäusen jedoch nachgewiesenermaßen das Calc1-Gen, auf dem die Kodierung für Calcitonin (CT) und  $\alpha$ -CGRP lokalisiert ist, fehlt, muß es sich bei den dargestellten Strukturen um  $\beta$ -CGRP-haltige Nervenfasern handeln, da der verwendete Antikörper gegen beide Formen des CGRP gerichtet ist.



8a



8b

**Abb. 8a. und 8b.: Calc1-defiziente Mäuse**

8a.: Großhirn, positive Darstellung von CGRP in Axonen und Perikaryen (braun) mit dem Anti-CGRP-Antikörper (Vergrößerung 1: 400),

8b.: Negativkontrolle (Primärantikörper fehlt), es erfolgte hier keine Darstellung von CGRP-haltigen Strukturen (Vergrößerung 1: 400).

### 6. Diskussion

#### 6.1. Neuronale Regulation der Knochendichte

Der Knochen ist ein dem stetigen Umbau unterworfenen Organ. Diese kontinuierlich stattfindenden, physiologischen Umbauvorgänge ermöglichen eine stets optimale Adaptation an die Anforderungen, welche die Umwelt an den Organismus stellt. Neben den Knochenzellen, der mineralisierten und der nicht mineralisierten Knochenmatrix, dem Knochenmark und dem Knorpel sind Nervenfasern ein weiterer Bestandteil des Knochens. Die mögliche Bedeutung der Nervenfasern für den Knochenstoffwechsel lässt sich indirekt aus klinischen Beobachtungen an Patienten mit neurologischen Funktionsstörungen, bei denen lokalisierte Osteopenien, erhöhte Knochenbrüchigkeit, Veränderungen in der Frakturheilung sowie exzessive Kallusformationen vermerkt werden konnten, ableiten (Freehafer und Mast, 1965). Gleiches konnte tierexperimentell an Denervations- und Knochenfrakturmodellen an der Ratte nachgewiesen werden (Aro, 1985, Edoff et al., 1997, Adam et al., 2000).

In vorausgegangenen Studien konnten Nervenzellen in Knochen von Ratten (Thurston, 1982, Schwab et al., 1997) und von Menschen (Miller et al., 1963) an verschiedenen Lokalisationen im Knochen nachweisen werden. Ebenso wurden Nervenfasern am Periost (Hill et al., 1991) und am Knorpel (Edoff et al., 2000) von Rattenknochen nachgewiesen. Im Gegensatz zu den zahlreichen vorliegenden Daten zum Vorhandensein und zur Darstellungen von Nervenfasern in Rattenknochen ist die Datenlage hinsichtlich der Nervenfasern in Knochen von Mäusen, welche eine wichtige Rolle in der Forschung auf dem Gebiet der Knochenbiologie spielen, sind bislang jedoch sehr spärlich.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal in der Literatur durch verschiedene Färbemethoden eine topographische Darstellung der Verteilung von Nervenfasern im Allgemeinen sowie von CGRP-haltigen Nervenfasern im Besonderen in Knochen von Mäusen durchgeführt werden. Es fanden sich Übereinstimmungen der Lokalisation der Nervenfasern mit den in der Literatur beschriebenen Topographien der Nerven-

fasern in Rattenknochen (Hara-Irie et al. 1996, Hukkanen et al. 1992 und 1993, Imai et al. 2002, Irie et al. 2002, Konttinen et al. 1996, Serre et al. 1999).

Die Nervenfasern gelangen als dünne, vom Periost in Begleitung von Blutgefäßen ziehende oder auch als isoliert verlaufende Fasern in den Knochen. Sie verlaufen unter anderem in den Volkmann'schen- und Havers'schen Kanälen der Kortikalis und gelangen so in den Markraum. Das Periost wird von einem dichten, mehrschichtigen Netz von einander kreuzenden, vornehmlich jedoch parallel zur Längsachse der Kortikalis des jeweiligen Knochens verlaufenden Nervenfasern, teilweise in Begleitung von Blutgefäßen, durchzogen. Von hier aus dringen einige dieser Nervenfasern in den Knochen ein. Dickere Nerven betreten die Markhöhle zusammen mit den Aa. nutrientes durch deren Foramina. Kleinere Nerven finden sich ebenfalls diffus im Endost verteilt, von wo aus kleinere Äste wiederum in die Kortikalis eintreten. Topographisch findet sich die Mehrzahl der Nerven in der Nähe der Epiphysenfuge und im Periost, d.h. in Gebieten hoher osteogener Aktivität. Die im Markraum verlaufenden Nervenfasern finden sich zum Einen in direkter Begleitung von Blutgefäßen, sowohl von Arterien und Arteriolen, als auch von Venen, Venolen und Sinusoiden, zum Anderen aber auch als einzelne, frei verlaufende Nervenfasern, welche vornehmlich zu den Trabekeln, dem Endost der Kortikalis oder auch zu den Chondrozyten in der Epiphyse ziehen.

Nervenfasern enthalten Neuropeptide, über deren Ausschüttung Stoffwechsellvorgänge beeinflusst werden können. Diese im Knochen lokalisierten Nervenfasern erhalten durch die Untersuchungen diverser Forschungsgruppen, die die Einflussnahme des sympathischen Nervensystems über Neurotransmitter auf den Knochen nachweisen konnten, eine neue und aktuelle Bedeutung (Ducy et al., 2000, Takeda et al., 2002). Zu den bis dato im Knochen nachgewiesenen Neuropeptiden gehören SP (Substanz P), CGRP (Calcitonin gene related peptide), VIP (Vasoactive intestinal polypeptide), NPY (Neuropeptide Y) und TH ( Tyrosin Hydroxylase ) (Bjurholm,1991). Die Erkenntnis, dass neuropeptiderge Nervenfasern besonders häufig in metabolisch aktiven Regionen zu finden sind, lässt darauf schließen, dass Neuropeptide zumindest einen teilweisen Einfluss auf die Stoffwechsellvorgänge im Knochen haben. Si-

sask et al. zeigten beispielsweise an Ratten, dass die Entwicklung der autonomen Innervation des Knochens parallel zum Mineralisationsprozess verläuft, wobei das Auftreten der cholinergen NPY-haltigen Fasern zeitlich dem der noradrenergen VIP-haltigen Fasern vorangeht. Entsprechend dem Mineralisationsprozess treten die autonomen Nervenfasern zeitlich versetzt zuerst in den Diaphysen, danach in den Metaphysen und zuletzt in den Epiphysen auf (Sisask et al., 1996). Andere Arbeitsgruppen wiesen die Hemmung der durch das Parathormon (PTH) induzierten Effekte auf Osteoblasten durch NPY nach, eine Rezeptorinteraktion zwischen einem lokalen Neuropeptid und einem systemischen kalziumregulierenden Hormon. Die Nachweise von Rezeptoren für CGRP, VIP, NA und NPY im Knochen deuten ebenfalls auf neuroendokrine Einflüsse in der Knochenphysiologie hin (Bjurholm, 1991; Sisask, 1996). Die Entdeckung der den Knochenstoffwechsel beeinflussenden Wirkung des von den Adipozyten produzierten Hormons Leptin wies dem Nervensystem bei der Regelung der Knochen-Homöostase eine neue Bedeutung zu. Es konnte gezeigt werden, dass die Effekte des Leptin nicht auf auto-/parakrinem Weg zum Erfolgsorgan, nämlich dem Knochen transportiert wurden, sondern auf nervalem Weg über das sympathische Nervensystem dorthin gelangten (Ducy et al., 2000, Takeda et al., 2002).

### 6.2. CGRP am Knochen

Schinke et al. konnten anhand von Experimenten an Mäusen zeigen, dass  $\alpha$ -CGRP ein physiologischer Aktivator der Knochenformation ist, da die spezifische Deletion von  $\alpha$ -CGRP in einer erniedrigten Knochendichte, einer Osteopenie mit erniedrigter Knochenformationsrate, resultiert (2004) während transgene Mäuse mit Expression von  $\alpha$ -CGRP unter einem osteoblasten-spezifischen Promotor eine erhöhte Knochenmineraldichte aufweisen (Ballica et al., 1999). In Untersuchungen an Calc1(-/-)-defizienten Mäusen, denen sowohl das Calcitonin (CT) als auch das  $\alpha$ -CGRP fehlte, fand sich eine erhöhte Knochenformationsrate (Schinke et al., 2004).

Bisher wenig untersucht ist die Rolle des dem  $\alpha$ -CGRP verwandten  $\beta$ -CGRP, eines Peptids, welches gerade aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zum  $\alpha$ -CGRP noch



Gegenstand weiterer Forschung hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf den Knochenstoffwechsel werden könnte. Es ist deutlich seltener in Nervenfasern im Knochen nachzuweisen ( $\alpha$ -CGRP: $\beta$ -CGRP im Verhältnis von 3-6:1) (Mulderry et al., 1988) und daher bislang nicht in dem Maße wie das  $\alpha$ -CGRP beachtet worden. Obgleich sich bei  $\beta$ -CGRP(-/-)-defizienten Mäusen keine Änderung im Knochenphänotyp finden lässt, kommt es bei Calc1(-/-)-defizienten Mäusen zu einer Überexpression von  $\beta$ -CGRP, welche einen möglichen Einfluss auf die hohe Knochenformationsrate dieser Mäuse haben könnte (Huebner et al., 2008). Da aber noch viel Unklarheit über seine Eigenschaften besteht, sollte dieses Neuropeptid in näherer Zukunft in den Fokus der weiteren Forschung gerückt werden.

### 6.3. Klinische Relevanz

Die klinische Relevanz des Vorhandenseins dieser Nervenfasern und ihres Einflusses auf den Knochenstoffwechsel wird durch Krankheitsbilder wie die Osteoporose, die jährlich Milliarden Euro Kosten europaweit verursacht, oder auch durch die sympathische Reflexdystrophie, eine jeden betroffenen Patienten sehr stark belastende Erkrankung, welche unter anderem neben starken Schmerzen und Muskelatrophie auch mit einer lokalen Osteoporose einhergeht, betont. Therapien, welche sich in der Zukunft durch die Modulation der Funktion der verantwortlichen Nervenfasern ergeben können, sind ein Weg, die Osteoporose und andere Erkrankungen des Knochenstoffwechsels, wie die oben erwähnte sympathische Reflexdystrophie zu heilen und gleichzeitig das Gesundheitssystem in seinen Ausgaben, die sich durch die Behandlung der Folgen dieser Erkrankungen ergeben, zu entlasten.

Es konnte in Studien nachgewiesen werden, dass Leptin-defiziente Mäuse einen erniedrigten Sympathikotonus aufweisen (Young et al., 1983) und dass die Wirkung von Leptin auf den Knochenstoffwechsel über den ventromedialen Hypothalamuskern, unter der Voraussetzung eines intakten sympathischen Nervensystems, vermittelt wird (Takeda et al., 2002). Darüber hinaus konnte der die Knochenmasse reduzierende Effekt des Leptin durch Gaben von  $\beta$ -Blockern aufgehoben werden.

Bisher noch nicht geklärt ist jedoch der genaue Mechanismus, über den dieses Hormon seinen Einfluss vom Hypothalamus aus auf den Knochenstoffwechsel ausübt. Die sich aus diesen Studienergebnissen ergebenden Implikationen für eine künftige medikamentöse Therapie z.B. der Osteoporose bedürfen noch weiterer, insbesondere auch klinischer Studien, nachdem die derzeit noch am Tiermodell erbrachten Ergebnisse auf den Menschen übertragen und reproduziert werden konnten. Wichtig ist auch die Identifikation des effektorischen Weges zwischen Hypothalamus und Knochen.

Veröffentlichte Erfolge bei der Therapie der sympathischen Reflexdystrophie durch Gaben von Beta-Blockern, einer Erkrankung, die unter anderem mit einer lokalen Osteoporose einhergeht (Schwartzman, 2000), geben Grund zu der Hoffnung, dass die bisher am Mausmodell gefundenen Erkenntnisse auf den Menschen übertragen werden könnten. Bonnet et al. veröffentlichten 2007 die Ergebnisse einer klinischen Studie, der zufolge die Einnahme von Beta-Blockern mit einem erniedrigten Frakturrisiko bei postmenopausalen Frauen vergesellschaftet ist. Teilweise sei dieser Effekt, so die Arbeitsgruppe, auf Einflüsse der Beta-Blocker auf die Knochenmineraldichte, die trabekuläre Knochenstruktur und auch auf die Kortikalis des Knochens zurückzuführen. Diese Ergebnisse geben einen möglichen positiven Ausblick auf künftige potentielle Therapieregime der postmenopausalen Osteoporose. Weitere klinische Studien müssen nun die Erfolge dieser Therapien bestätigen.

### **7. Zusammenfassung**

Klinische Beobachtungen an Patienten mit neurologischen Erkrankungen und tierexperimentelle Studien mittels Fraktur- und Denervationsmodellen der betroffenen Extremität weisen auf einen neuronalen Steuerungsmechanismus der Knochen-Homöostase hin. Obgleich eine Vielzahl von Veröffentlichungen zur Topographie von Nervenfasern in Rattenknochen besteht, gab es bislang keine Beschreibung der Lage von Nervenfasern in Knochen von Mäusen. Da jedoch das Mausmodell ein etabliertes Instrument zur Untersuchung der Funktion des Knochens und seiner Regulationsmechanismen ist, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, eine Darstellung von und Übersicht über den Verlauf der Nervenfasern im Knochen der Maus zu geben. Ein besonderer Schwerpunkt lag zudem auf der Darstellung von Nervenfasern, welche das Neuropeptid CGRP enthielten, da es sich angesichts neuer Studienergebnisse um einen wichtigen Botenstoff innerhalb der neuronalen Regulation des Knochenstoffwechsels zu handeln scheint.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Knochen, wie alle anderen Körperorgane auch, von einer Vielzahl von Nervenfasern erreicht wird. Diese umgeben den Knochen nicht nur als dichtes Netz innerhalb des Periosts, der Knochenhaut, sondern sie verlaufen auch als freie Nervenfasern innerhalb der Markhöhle und erreichen so die Knochen trabekel, entlang derer sie weiter ziehen. Die Nervenfasern durchziehen die Kortikalis des Knochens in den knocheneigenen Volkman- und Havers-Kanälen und verlaufen in Begleitung von Blutgefäßen durch den Markraum und die Kortikalis.

Zur genauen Klärung der Art und Weise, mit der das zentrale Nervensystem die Auf- und Abbauprozesse im Knochen steuert, müssen noch weitere Studien durchgeführt werden. Insbesondere molekularbiologische Verfahren wie die Erschaffung und Untersuchung transgener Mäuse und sogenannter Knockout-Mäuse ermöglichen hierbei Untersuchungen der Wirkungsweise einzelner Gene und Substanzen und können weiteren Aufschluss über die Funktion der in den Nervenfasern enthaltenen Neu-

## 7. Zusammenfassung

---

rotransmitter im Hinblick auf ihre Rolle in der Regulation des Knochenstoffwechsels geben.

## 8. Literaturverzeichnis

Adam C, Llorens A, Baroukh B, Cherruau M, Saffar JL (2000) Effects of Capsaicin-Induced Sensory Denervation on Osteoclastic Resorption in Adult Rats. *Exp Physiol* 85(1):62-6

Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM (1982) Alternative RNA Processing in Calcitonin Gene Expression Generates mRNAs Encoding Different Polypeptide Products. *Nature* 298:240-244

Aoki M, Tamai K, Saotome K (1994) Substance P- and Calcitonin Gene-Related Peptide-Immunofluorescent Nerves in the Repair of Experimental Bone Defects. *Int Orthop* 18:317-324

Aro H (1985) Effect of Nerve Injury on Fracture Healing. *Acta Orthop Scand* 56, 233-237

Ash P, Loutit JF, Townsen KM (1980) Osteoclasts Derived from Haemopoietic Stem Cells. *Nature* 283:669-670

Ballica R, Valentijn K, Khachatryan A, Guerder S, Kapadia S, Gundberg C, Gilligan J, Flavell RA, Vignery A (1999) Targeted Expression of Calcitonin Gene-Related Peptide to Osteoblasts Increases Bone Mineral Density in Mice. *J Bone Miner Res* 14:1067-1074

Bernard GW, Shih C (1990) The Osteogenic Stimulating Effect of Neuroactive Calcitonin Gene-Related Peptide. *Peptides* 11:625-632

Bjurholm A (1990) Neuroendocrine Peptides in Bone. *Int Orthop* 15:325-329

## 8. Literaturverzeichnis

---

Bonnet N, Gadois C, McCloskey E, Lemineur G, Lespessailles E, Courteix D, Benhamou CL (2007) Protective Effect of Beta Blockers in Postmenopausal Women: Influence on Fractures, Bone Density, Micro and Macroarchitecture. *Bone* 40(5): 1209-16

Brain SD, Williams TJ, Tippens JR, Morris HR, MacIntyre I (1985) Calcitonin Gene-Related Peptide is a Potent Vasodilator. *Nature* 313:54-56

Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R (1995a) Bone Biology. Part I. Structure, Blood Supply, Cells, Matrix, and Mineralisation. *J Bone Joint Surg* 77-A:1256-1275

Buma P (1994) Innervation of the Patella. An immunohistochemical Study in Mice. *Acta Orth Scand.* 65 (1): 80-6

Cornish J, Callon KE, Lin CQ, Xiao CL, Gamble GD, Cooper GJ, Reid IR (1999) Comparison of the Effects of Calcitonin Gene-Related Peptide and Amylin on Osteoblasts. *J Bone Miner Res* 14:1302-1309

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G (2000) Leptin Inhibits Bone Formation Through a Hypothalamic Relay: A Central Control of Bone Mass. *Cell* 100:197-207

Edoff K, Hellman J, Persliden J, Hildebrand C (1997) The Developmental Skeletal Growth in the Rat Foot is Reduced After Denervation. *Anat Embryol* 195: 531-538

Edoff K, Grenegard M, Hildebrand C (2000) Retrograde Tracing and Neuropeptide Immunohistochemistry of Sensory Neurones Projecting to the Cartilaginous Distal Femoral Epiphysis of Young Rats. *Cell Tissue Res* 299: 193-200

Freehafer AA, Mast WA (1965) Lower Extremity Fractures in Patients With Spinal Cord Injury. *J Bone Joint Surg Am* 47:683-694

Haberland M, Schilling FA, Rueger JM, Amling M (2001) Think Bone. The Novel Paradigm of Central Bone Mass Control. *Eur J Trauma* 27:218-225

Hara-Irie F, Amizuka N, Ozawa H (1996) Immunohistochemical and Ultrastructural Localization of CGRP-positive Nerve Fibres at the Epiphyseal Trabecules Facing the Growth Plate of Rat Femurs. *Bone*. 18:29-39

Hill EL and Elde R (1991) Distribution of CGRP-, VIP-, D $\beta$ H-, SP and NPY-immunoreactive Nerves in the Periosteum of the Rat. *Cell Tissue Res* 264: 469-480

Hosoi J, Murphy GF, Egan CL, Lerner EA, Grabbe S, Asahina A, Granstein RD (1993) Regulation of Langerhans Cell Function by Nerves Containing Calcitonin Gene-Related Peptide. *Nature* 363:159-163

Huebner AK, Keller J, Catala-Lehnen P, Perkovic S, Emeson RB, Amling M, Schinke T (2008) The Role of Calcitonin and  $\alpha$ -CGRP in Bone Formation. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May 15;473(2):210-7. Review

Hukkanen M, Konttinen YT, Rees RG, Gibson SJ, Santavirta S, Polak JM (1992) Innervation of Bone From Healthy and Arthritic Rats by Substance P and Calcitonin Gene-Related Peptide Containing Sensory Fibres. *J Rheumatol* 19:1252-1259

Hukkanen M, Konttinen YT, Santavirta S, Paavolainen P, Gu XH, Terenghi G, Polak JM. (1993) Rapid Proliferation of Calcitonin Gene-Related Peptide-Immunoreactive Nerves During Healing of Rat Tibial Fracture Suggests Neural Involvement in Bone Growth and Remodelling. *Neuroscience* 54:969-979

## 8. Literaturverzeichnis

---

Imai S, Matsusue Y (2002) Neuronal Regulation of Bone Metabolism and Anabolism: Calcitonin Gene-Related Peptide-, Substance P-, and Tyrosine Hydroxylase-Containing Nerves and the Bone. *Microsc Res Tech* 58:61-69

Irie K, Hara-Irie F, Hidehiro O, Yahjima T (2002) Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)-Containing Nerve Fibres in Bone Tissue and their Involvement in Bone Remodelling. *Microsc Res Tech* 58:85-9

Ishida-Yamamoto A, Tohyama M (1989) Calcitonin Gene-Related Peptide in the Nervous Tissue. *Progress in Neurobiology* Vol. 33, 335-386

Lacey, DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliot G, Scully S, Hsu H, Sullivann J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufmann S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin Ligand is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell* 93:165-76

Linder, JE. (1978) A Simple and Reliable Method for the Silver Impregnation of Nerves in Paraffin Sections of Soft and Mineralised Tissues. *J Anat* 127, 3: 543-551

Konttinen YT, Imai S, Suda A (1996) Neuropeptides and the Puzzle of Bone Remodelling: State of the Art. *Acta Orthop Scand* 67:632-639

Mach DB, Rogers SD, Sabino MC, Luger NM, Schwei MJ, Pomonis JD, Keyser CP, Clohisy DR, Adams DJ, O'Leary P, Manyth PW (2002) Origins of Skeletal Pain: Sensory and Sympathetic Innervation of the Mouse Femur. *Neuroscience* 113 (1):155-66

Marshall I, Al-Kazwini SJ, Holmann JJ, Craig RK (1986) Human and Rat  $\alpha$ CGRP but not Calcitonin Cause Mesenteric Vasodilatation in Rats. *Eur J Pharmacol* 123: 217-222



## 8. Literaturverzeichnis

---

Martin CD, Jimenez-Andrade JM, Ghilardi JR, Manyth PW (2007) Organization of a Unique Net-Like Meshwork of CGRP+ Sensory Fibres in the Mouse Periosteum: Implications for the Generation and Maintenance of Bone Fracture Pain. *Neurosci Lett.* 2007 Nov 12; 427 (3): 148-52

Miller MR, Kasahara M (1963) Observations on the Innervation of Human Long Bones. *Anatomical Record* 145, 13-23

Mulderry PK, Ghatei MA, Spokes RA, Jones PM, Pierson AM, Hamid QA, Kanse S, Amara SG, Burrin JM, Legon S, et al. (1988) Differential Expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by Primary Sensory Neurons and Enteric Autonomic Neurons of the Rat. *Neuroscience* 25(1):195-205

Nelson MT, Huang Y, Brayden JE, Hescheler J, Standen NB (1990) Arterial Dilations in Response to Calcitonin Gene-Related Peptide Involve Activation of K<sup>+</sup> -channels. *Nature* 344:770-773

Oh-hashii Y, Shindo T, Kurihara Y, Imai T, Wang Y, Morita H, Imai Y, Kayaba Y, Nishimatsu H, Suematsu Y, Hirata Y, Yazaki Y, Nagai R, Kuwaki T, Kurihara H (2001) Elevated Sympathetic Nervous Activity in Mice Deficient in  $\alpha$ CGRP. *Circ Res* 89: 983-990

Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Rivier J, Vale WW, Evans RM (1983) Production of a Novel Neuropeptide Encoded by the Calcitonin Gene Via Tissue-Specific RNA Processing. *Nature* 304:129-135

Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Numata Y, Tsuji T et al. (1999) Sympathetic Activation of Leptin Via the Ventromedial Hypothalamus: Leptin-induced Increase in Catecholamine Secretion. *Diabetes* 48:1787-1793

## 8. Literaturverzeichnis

---

Schinke T, Liese S, Priemel M, Haberland M, Schilling AF, Catala-Lehnen P, Blicharski D, Rueger JM, Gagel RF, Emeson RB, Amling M (2004) Decreased Bone Formation and Osteopenia in Mice Lacking  $\alpha$ -Calcitonin Gene-Related Peptide. *J Bone Miner Res* 19:2049-2056

Schwab W, Bilgicyildirim A, Funk RHW (1997) Microtopography of the Autonomic Nerves in the Rat Knee: A Fluorescence Microscopic Study. *The Anatomical Record* 247: 109-118

Schwartzman RJ (2000) New Treatments for Reflex Sympathetic Dystrophy. *N Engl J Med* 343: 654-656

Serre CM, Farlay D, Delmas PD, Chenu C (1999) Evidence for a Dense and Intimate Innervation of the Bone Tissue, Including Glutamate-Containing Fibres. *Bone* 25 (6): 623-629

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennet L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliot R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw Gregg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* 89: 309-319

Takeda S, Elefteriou F, Karsenty G (2003) Common Endocrine Control of Body Weight, Reproduction, and Bone Mass. *Annu Rev Nutr* 23:403-411

Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G (2002) Leptin Regulates Bone Formation Via the Sympathetic Nervous System. *Cell* 111:305-317

## 8. Literaturverzeichnis

---

Thurston TJ (1982) Distribution of Nerves in Long Bones as Shown by Silver Impregnation. *J Anat* 134, 4, 719-728

Uchida S, Yamamoto H, Iio S, Matsumoto N, Wang X-B, Yonehana N, Imai Y, Inoki R, Yashida H (1990) Release of Calcitonin Gene-Related Peptide-Like Immunoreactive Substance from Neuromuscular Junction by Nerve Excitation and its Action on Striated Muscle. *J Neurochem* 54:1000-1003

Villa I, Melzi R, Pagani F, Ravasi F, Rubinacci A, Guidobono F (2000) Effects of Calcitonin Gene-Related Peptide and Amylin on Human Osteoblast-Like Cells Proliferation. *Eur J Pharmacol* 409:273-278

Valentijn K, Gutow AP, Troiano N, Gundberg C, Gilligan JP, Vignery A (1997) Effects of Calcitonin Gene-Related Peptide on Bone Turnover in Ovariectomized Rats. *Bone* 21:269-274

Young JB, Landsberg L (1983) Diminished Sympathetic Nervous System Activity in Genetically Obese (ob/ob) Mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 245: E148-E154

Zaidi M, Chambers TJ, Gaines Das RE, Morris HR, MacIntyre I (1987b) A Direct Action of Human Calcitonin Gene-Related Peptide on Isolated Osteoclasts. *J Endocrinol* 115:511-518

Zaidi M, Fuller K, Bevis PJR, Gaines Das RE, Chambers TJ, MacIntyre I (1987c) Calcitonin Gene-Related Peptide Inhibits Osteoclastic Bone Resorption: A Comparative Study. *Calcif Tissue Int* 40: 149-154

### **9. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. J.M. Rueger für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung von Arbeitsmitteln und das entgegengebrachte Interesse für die vorliegende Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. Michael Amling sowie Herrn Priv.-Doz. Dr. rer.-nat. Thorsten Schinke danke ich für die Betreuung, den intellektuellen Beitrag zur vorliegenden Arbeit und die Unterstützung, die sie mir haben zukommen lassen.

Cordula Erdmann (geb. Müldner) gilt mein besonderer Dank für die Einarbeitung in die wichtigen Methoden der Immunhistochemie sowie für die Hilfestellung bei der Fehlersuche und Verfeinerung der Methoden.

Für hilfreiche Anregungen möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Amling bedanken.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meinen Ehemann Jens, an meine Eltern, meinen Bruder und besonders auch an Teresa Müller und Anja Peters, ehemalige Mitglieder der „Großraum-WG Winterhude“, ohne deren liebevollen Beistand und unermüdliche Unterstützung in allen Lebenslagen diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre.

## 10. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....

Dagmar Hartmann