

# **Die Blockade des Neuropilin-2 als mögliches therapeutisches Prinzip bei Arthritis**



## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

der naturwissenschaftlichen Fakultät IV für Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Alexander Fassold

Regensburg, Dezember 2009

# **Dissertation**

durchgeführt von März 2006 bis Dezember 2009  
an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I der Universität Regensburg  
unter Anleitung von

Prof. Dr. rer. nat. Achim Göpferich  
Institut für Pharmazie

und

Prof. Dr. med. Rainer H. Straub  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

**Promotionsgesuch eingereicht am 22.12.2009**

## **Prüfungsausschuss:**

Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. Jens Schlossmann
1. Gutachter (1. Prüfer):	Prof. Dr. rer. nat. Achim Göpferich
2. Gutachter (2. Prüfer):	Prof. Dr. med. Rainer H. Straub
3. Prüfer:	Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heilmann

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Rheumatoide Arthritis .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 Definition .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2 Ätiologie und Pathogenese .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3 Genetik.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.4 Diagnose.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.5 Therapie.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Experimentelle Arthritismodelle .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3 Sympathisches Nervensystem .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.1 Anatomische Grundlagen.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.2 Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems .....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.3 Regulation des Immunsystems.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4 Mechanismen der axonalen Wegfindung.....</b>	<b>24</b>
<b>1.4.1 Semaphorine .....</b>	<b>27</b>
<b>1.4.2 Neuropiline .....</b>	<b>30</b>
<b>1.4.3 Plexine .....</b>	<b>33</b>
<b>1.4.4 Die Rolle von GTPasen im Plexin-vermittelten Signalweg .....</b>	<b>34</b>
<b>1.4.5 Neurotrophine .....</b>	<b>36</b>
<b>1.5 Zielsetzung .....</b>	<b>39</b>
<b>2 Material.....</b>	<b>40</b>
<b>2.1 Laborgeräte .....</b>	<b>40</b>
<b>2.2 Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>41</b>
<b>2.3 Substanzen, Chemikalien und Reagenzien.....</b>	<b>41</b>
<b>2.4 Kits und Enzyme .....</b>	<b>42</b>
<b>2.5 Zelllinien.....</b>	<b>43</b>
<b>2.6 Lösungen, Medien und Puffer .....</b>	<b>43</b>
<b>2.7 Größenstandards .....</b>	<b>44</b>

<b>3 Methoden .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1.1 Isolierung von RNA aus Ganglien.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR) .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2 Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.1 SDS-PAGE .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.2 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen (Blotten) .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2.3 Immunodetektion der Proteine.....</b>	<b>50</b>
<b>3.3 Herstellung des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukts .....</b>	<b>51</b>
<b>3.4 Immunohistochemie .....</b>	<b>52</b>
<b>3.4.1 Färbung von sympathischen Mausganglien .....</b>	<b>52</b>
<b>3.4.1.1 Tyrosinhydroxylase-Fluoreszenzfärbung .....</b>	<b>52</b>
<b>3.4.1.2 NPN-2-Fluoreszenzfärbung .....</b>	<b>54</b>
<b>3.4.2 Färbung von Synovialgewebe (Patientenmaterial) .....</b>	<b>54</b>
<b>3.4.2.1 NPN-2-Fluoreszenzfärbung .....</b>	<b>54</b>
<b>3.4.2.2 Semaphorin 3C-Färbung .....</b>	<b>55</b>
<b>3.4.2.3 Semaphorin 3F-Färbung .....</b>	<b>56</b>
<b>3.5 Neuriten-Auswachs-Assay .....</b>	<b>58</b>
<b>3.6 Oberflächen-Plasmon-Resonanz.....</b>	<b>60</b>
<b>3.7 Arthritisinduktion bei DBA/1-Mäusen.....</b>	<b>62</b>
<b>3.8 Superfusion von synovialem Gewebe.....</b>	<b>64</b>
<b>3.9 ELISA .....</b>	<b>64</b>
<b>3.10 Statistik .....</b>	<b>65</b>
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>66</b>
<b>4.1 Nachweis der Tyrosinhydroxylase und des NPN-2 auf sympathischen Ganglien im Matrikel.....</b>	<b>66</b>
<b>4.2 Dichte von NPN-2-positiven Nervenfasern im Synovialgewebe .....</b>	<b>67</b>
<b>4.3 Histochemische Färbung von Semaphorin 3C und Semaphorin 3F bei RA-Patienten und anderen Autoimmunerkrankungen.....</b>	<b>68</b>

<b>4.4 NPN-2 Fc-Fusionskonstrukt .....</b>	<b>71</b>
4.4.1 Klonierung des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukts.....	71
4.4.2 Expression und Reinigung des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukts.....	72
<b>4.5 Einsatz des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukturts im Tiermodell .....</b>	<b>73</b>
<b>4.6 Lösliches NPN-2 in Körperflüssigkeiten .....</b>	<b>75</b>
<b>4.7 Bindungseigenschaften zwischen Semaphorin 3F und NPN-2 Fc-Fusionskonstrukt .....</b>	<b>77</b>
<b>4.8 Effekte von Semaphorin 3F im Neuriten-Auswachs-Assay.....</b>	<b>78</b>
<b>4.9 Dosisabhängige Effekte von Semaphorin 3F mit und ohne NPN-2 Fc-Fusionskonstrukt .....</b>	<b>82</b>
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>85</b>
5.1 Nachweis der Tyrosinhydroxylase und des NPN-2 auf sympathischen Ganglien im Matrikel.....	85
5.2 Bedeutung des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukturts in der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis .....	86
5.3 Neuriten-Wachstumsassay .....	88
5.4 Bedeutung von Semaphorin 3C und Semaphorin 3F und ihres Rezeptors NPN-2 für die Entzündungsreaktion.....	89
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>93</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>8 Anhang .....</b>	<b>112</b>
8.1 Lebenslauf .....	112
8.2 Publikationen.....	113
8.3 Vorträge .....	114
8.4 Posterpräsentationen .....	114
8.5 Danksagung.....	116
8.6 Eidesstattliche Erklärung .....	118

# Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare, <i>base pairs</i>
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CFA	Komplettes Freund-Adjuvans
CIA	Kollagen Typ II induzierte Arthritis
CII	Kollagen Typ II
DAPI	4,6-Diaminido-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco´s modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang, <i>double strand</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
GSK-3β	Glycogen Synthase Kinase-3β
h	Stunde(n)
HBSS	<i>Hank´s balanced salt solution</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure

His	Histidin
HSA	humanes Serumalbumin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IκB	<i>inhibitory κB</i>
JNK	<i>c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase</i>
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar, mol/l
m/V	Masse pro Volumen
mA	Milliampere
mAb	monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mg	Milligramm
μl	Mikroliter
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger Ribonucleinsäure</i>
n.s.	nicht signifikant
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NPN-2fc	Neuropilin-2 Fc-Fusionskonstrukt
OA	Osteoarthrose
p	statistischer P-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase Typ A
PNS	parasympathisches Nervensystem
RA	rheumatoide Arthritis

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur (21°C-25°C)
s	lösliches, <i>soluble</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
SNS	sympatisches Nervensystem
ss	Einzelstrang-, <i>single-strand</i>
TH	Tyrosinhydroxylase
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
V/V	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Rheumatoide Arthritis

### 1.1.1 Definition

Millionen Menschen in Deutschland leiden an rheumatischen Erkrankungen, im Volksmund kurz als "Rheuma" bezeichnet. Unter dem Begriff Rheuma verbirgt sich jedoch ein breites Spektrum von etwa 400 versch. Erkrankungen, die oft ganz unterschiedlicher Natur sind. So unterscheidet man zwischen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, den degenerativbedingten, verschleißbedingten rheumatischen Erkrankungen wie der Arthrose und den weichteilrheumatischen Erkrankungen. Außerdem gibt es noch die Gruppe der stoffwechselbedingten Erkrankungen und weitere seltene rheumatische Erkrankungen. Aus diesem Grund sprechen Mediziner auch vom rheumatischen Formenkreis. Die Unterscheidung in entzündliches und degeneratives Rheuma ist allerdings nicht ganz unproblematisch, da auch bei entzündlichen Arthritiden degenerative Vorgänge und umgekehrt bei der Arthrose auch Entzündungsprozesse auftreten [1]. Die rheumatoide Arthritis, auch chronische Polyarthritis oder kurz RA genannt, ist die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung [2]. Meist ist, wenn allgemein von Rheuma die Rede ist, die rheumatoide Arthritis gemeint.

Untersuchungen zur Häufigkeit der RA ergaben, dass weltweit ca. 0,5 bis 1% der Bevölkerung an dieser Krankheit leiden [3]. Zugleich gilt sie als die schmerhafteste und unberechenbarste unter den entzündlichen Gelenkerkrankungen. An einer RA können Männer wie Frauen erkranken, allerdings sind zwei- dreimal mehr Frauen als Männer betroffen. Die Krankheit tritt in praktisch jedem Alter auf, am häufigsten entwickeln sich die Beschwerden jedoch zwischen dem dritten und dem fünften Lebensjahrzehnt [4; 5].

Die RA ist eine systemische Autoimmunerkrankung mit immungenetischer Disposition. Bevorzugt werden die synovialen Strukturen der körperfernen Grund- und Mittelgelenke der Finger und Hände befallen. Manchmal treten die Beschwerden aber auch zuerst an der Hüfte, am Knie oder den Zehen auf.



**Abb. 1.1: Klinische Manifestationen der rheumatoïden Arthritis im Endstadium**

Im Frühstadium der Erkrankung sind nur wenige Gelenke betroffen. Häufig sind die Hand- und Fingergelenke betroffen. Im Endstadium sind viele große und kleine Gelenke des Körpers betroffen (Polyarthritis). In diesem späten Stadium sind die Funktionen der Gelenke durch Subluxationen und Fehlstellungen sehr stark eingeschränkt. Quelle: <http://www.markusflueck.ch/images/medicaleducationan17.jpg>

Die RA ist aber keine reine Gelenkerkrankung. Sie ist eine Allgemeinerkrankung mit mehr oder weniger stark ausgeprägten Allgemeinsymptomen. Neben den Gelenken sind oft auch das gelenknahe Gewebe, wie Bindegewebe, Sehnen und Muskeln, und manchmal sogar die Nerven betroffen. Da die Entzündungen auch die inneren Organe, wie Herz, Blutgefäße, Lungen, Lymphknoten und Augen betreffen können, wird die RA als systemische Erkrankung bezeichnet. Dies hängt damit zusammen, dass die zugrunde liegende Störung im Immunsystem liegt und das Immunsystem in alle Bereiche des Körpers hineinwirken kann. In ihrem Verlauf führt sie zu fortschreitender Gelenkzerstörung, zum Befall weiterer Gelenke, zu Gelenksverformungen und dadurch zu zunehmenden Bewegungseinschränkungen und Verlust der Gelenkfunktion, seltener auch zu Organbeteiligungen (Augen, Speichel- und Tränendrüsen, Haut, Herz, Lunge). Dabei sind typischerweise die Gelenke beider Körperhälften betroffen; Mediziner sprechen von einem symmetrischen Auftreten [1].

Rheumatische Erkrankungen wie die RA führen nur selten zum Tod (können aber auch die Lebenserwartung um 3 bis 18 Jahre verkürzen [6]), sie sind jedoch meist sehr schmerhaft, entwickeln sich häufig chronisch und schränken die Lebensqualität vieler Menschen stark ein. Die RA ist in der westlichen Welt die häufigste Ursache für eine krankheitsbedingte Behinderung und hat Auswirkungen auf das soziale oder berufliche Leben. Nach 2 Jahren sind fast 40% der RA-Patienten krankheitsbedingt berentet, nach 5 Jahren mehr als 60%. Nach 10 Jahren sind 17% der Patienten an

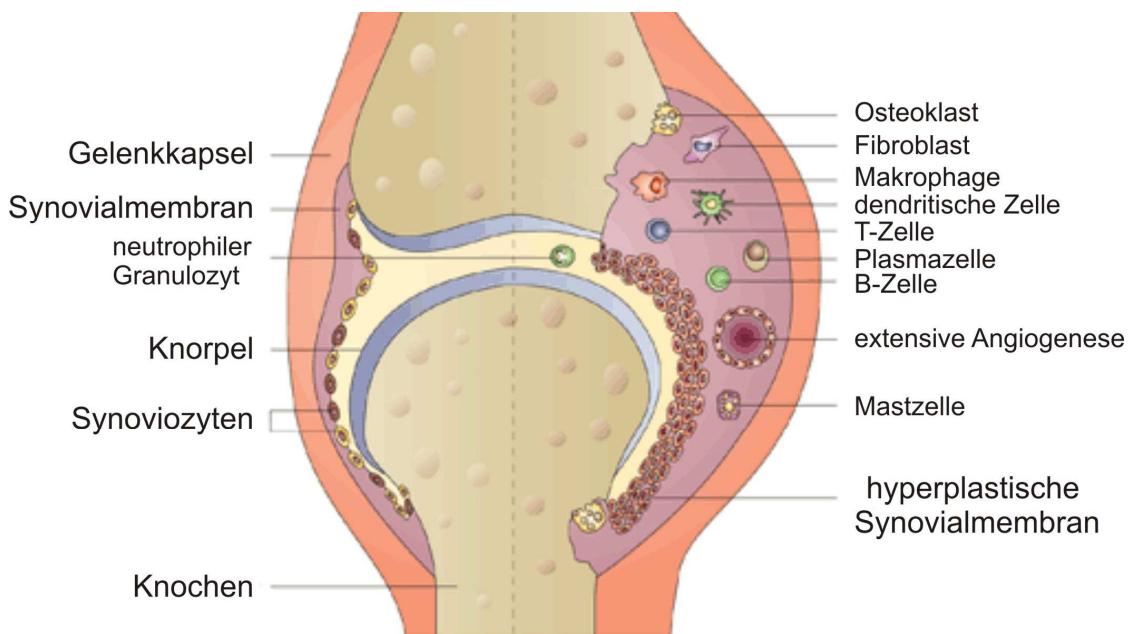
großen Gelenken operiert (künstliche Hüft- oder Kniegelenke), 10% sind schwerstbehindert [7]. So bringt die Erkrankung auch enorme sozioökonomischen Kosten mit sich. Eine französische Studie zeigte, dass sich die Kosten pro Jahr und Patient auf ca. 9400 € bei leichten Formen und auf ca. 40700 € bei schweren Formen belaufen [8].

### 1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Zuallererst muss man sagen, dass die genaue Ursache der RA bis heute noch nicht bekannt ist. Man geht heute davon aus, dass die RA ein multifaktorieller Prozess ist, bei dem ein Trigger aus der Umwelt (z.B. Rauchen und Infektionserreger) spezifische posttranskriptionale Modifikationen (z.B. Citrullinierung von Proteinen) hervorruft, welche daraufhin Immunantworten (z.B. Antikörper gegen citrullinierte Proteine) in genetisch empfänglichen Individuen (z.B. shared Epitop) auslösen [9; 10]. Das eigene Immunsystem sorgt also dafür, dass sich dessen Zellen und Abwehrstoffe gegen körpereigene Gelenkstrukturen richten und diese zerstören. Dieses Phänomen bezeichnet man als Autoimmunität oder Autoaggressivität. Es wird vermutet, dass in einem ersten Schritt Fremd- oder Autoantigene durch aktivierte Makrophagen prozessiert und auf MHC-Klasse II-Moleküle des Typs HLA-DR4 an CD4<sup>+</sup>-T-(Helfer)-Lymphozyten präsentiert werden. Zelluläre und humorale Immunreaktionen gegen verschiedene Autoantigene werden im Krankheitsverlauf häufig beobachtet. Solche krankheitsassoziierten Autoantigene können z.B. auch Knorpel-Proteoglykane, Kollagen Typ II, Glucose-6-Phosphat Isomerase und Hitzeschock-Proteine sein [11; 13].

Die Entzündung eines Gelenks (Arthritis) geht von der Gelenkkinnenhaut (Synovialmembran) aus. Sie kleidet innen die Gelenkkapsel aus und bildet die Gelenkflüssigkeit oder auch Gelenkschmiere (Synovia). Die Gelenkkapsel ist eine bindegewebige Kapsel um das Gelenk, die das Gelenk umschließt und es gegenüber den umliegenden Strukturen quasi "abdichtet". Die Synovialmembran setzt an der Grenze zwischen Knochen und Knorpel an und umschließt die Gelenkhöhle. Sie besteht in gesunden Gelenken aus nur wenigen Zelllagen; ihre Oberfläche ist durch Ausstülpungen stark vergrößert. Entzündet sich aber die Gelenkkinnenhaut, bildet sie daraufhin verstärkt Gelenkflüssigkeit. Durch die verstärkte Bildung von Gelenkflüssigkeit gerät die Gelenkkapsel unter erhöhte Spannung, sie wird gedehnt,

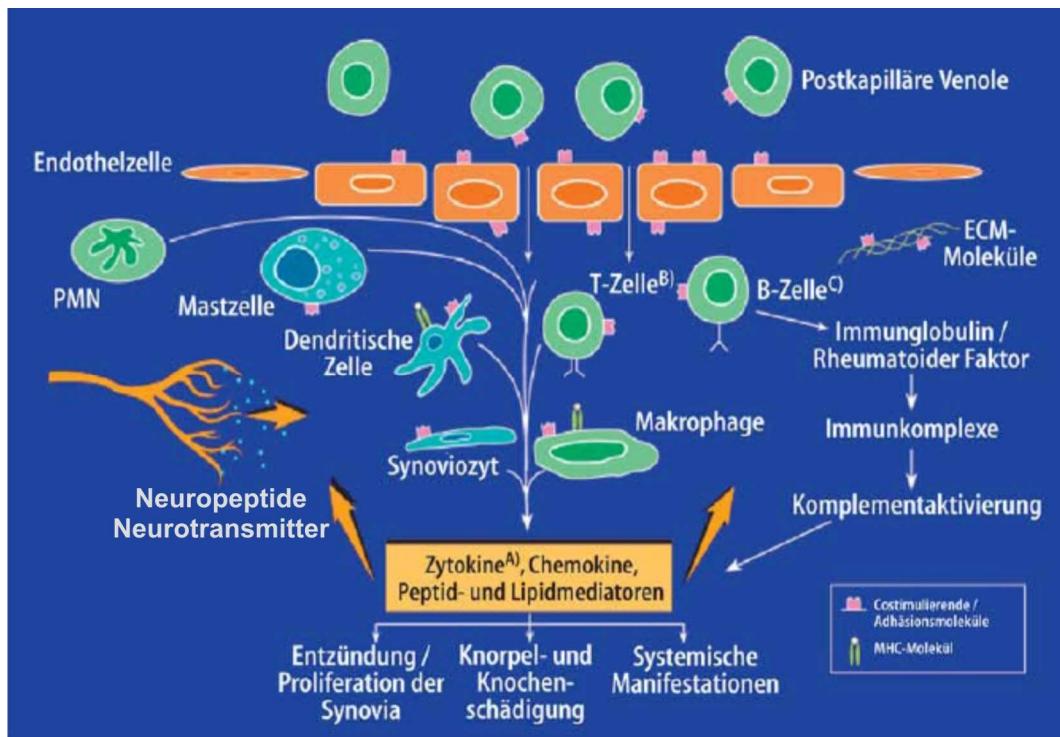
wodurch der Schmerz erzeugt wird. Zudem kommt hinzu, dass sich durch die Entzündung die Synovialmembran verdickt und sich fingerförmig in den Gelenkspalt vorstülpt und die Knorpeloberfläche überzieht. Durch das aktivierte Gefäßendothel können Entzündungszellen in das synoviale Gewebe migrieren. Die Synovialmembran kann sich im kranken Gelenk auf bis zu 10 Zelllagen und mehr verdicken [14]. Schließlich dringt sie als so genannter Pannus in den Knorpel ein und zerstört ihn dabei. Die Gelenkzerstörung resultiert also aus der Invasion der entzündeten Gelenkkinnenhaut in den artikulären Knorpel bzw. Knochen und ist das Resultat der in enger Wechselwirkung stehenden pathogenetischen Grundphänomene wie synoviale Hyperplasie, chronische Entzündung und pathologische Immunantwort.



**Abb. 1.2: Graphische Darstellung eines gesunden (links von der gestrichelten Linie) und eines arthritischen (rechts von der gestrichelten Linie) Gelenkes**

Bei der rheumatoiden Arthritis kommt es in den betroffenen Gelenken zu Beginn der Erkrankung zu einer Verdickung und Wucherung der Synovialmembran. Die eingewanderten Entzündungs- und Abwehrzellen führen durch Reizung der Synovialmembran zu einer vermehrten Produktion von Gelenkflüssigkeit mit Ausbildung eines Ergusses. Später bildet sich, von der Synovialmembran ausgehend, neues aggressives Gewebe (Pannus), das den Knorpel überdeckt, in den Knochen einwächst und schließlich Knorpel und Knochen zerstört. Modifiziert nach <http://www.krischenowski.de/rheumatoide-arthritis/images/rheumatoide-arthritis-1.bmp>

In einem gesunden Gelenk wiegt die Gelenkkinnenhaut etwa fünf Gramm, zum Pannusgewebe ausgewachsen kann sich ihr Gewicht auf bis zu 100 Gramm verzwanzigfachen. Der Pannus füllt im Extremfall den Gelenkspalt vollständig aus, sodass es dem Betroffenen nicht mehr möglich ist, das Gelenk zu bewegen. Die gesunde Gelenkkinnenhaut besteht vor allem aus Fibroblasten und wenigen Makrophagen. Im entzündeten Zustand jedoch wandern aus den Blutgefäßen massiv Entzündungszellen ein, vor allem verschiedene Abwehrzellen des Immunsystems, etwa B- und T-Lymphozyten sowie die Monozyten und neutrophile Granulozyten. Ihre Aufgabe ist es, die als körperfremd erkannten Substanzen und Krankheitserreger zu vernichten. Die von den aktivierten Monozyten/Makrophagen und Synoviozyten freigesetzten Zytokine stellen zentrale Vermittler der Entzündung, der Freisetzung von Prostaglandinen und Proteasen, der Synovialisproliferation, der Knorpel- und Knochenarrosion dar. Die Knorpel- und Knochenzerstörung bei RA wird zum einen durch ein Zytokin-Ungleichgewicht im entzündeten Synovium bestimmt. Im entzündeten RA-Gelenk besteht ein Zytokin-Ungleichgewicht mit einem Überangebot an so genannten pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF, IL-1, IL-6 und IL-8, GM-CSF) und einem relativen Mangel an inhibitorischen Zytokinen (IL-4, IL-10). Die pro-inflammatorischen Zytokine stimulieren die Chondrozyten zu einer vermehrten Produktion von Matrixmetalloproteininasen und anderer degradierender Produkte wie NO [15]. Durch den Einfluss der pro-inflammatorischen Zytokine wird von Osteoblasten (knochaufbauende Zellen) vermehrt RANKL sezerniert. RANKL bindet an seinen Rezeptor auf Makrophagen, wodurch eine Differenzierung zu Osteoklasten (knochenabbauende Zellen) veranlasst wird. Diese Osteoklasten sind neben Pannus, synovialen Fibroblasten und Makrophagen in den Verlust an Knochensubstanz involviert [16]. Zum anderen wurde gezeigt, dass die Gelenkerstörung auch dann voranschreiten kann, wenn die Entzündung gut kontrolliert ist [17] und dass entscheidende Schritte der Gelenkerstörung bereits in sehr frühen Stadien der Erkrankung auftreten [18]. Fibroblasten sind als wichtigste ortsständige Zellen der Gelenkkinnenhaut entscheidend an der Homöostase ihrer Struktur beteiligt. Untersuchungen der vergangenen zwei Jahrzehnte haben wesentlich zu der Erkenntnis beigetragen, dass Fibroblasten in der Pathogenese der RA eine zentrale Rolle spielen, indem sie zu einer Schaltzentrale der synovialen Gewebereaktion werden [19]. Gleichzeitig unterliegen sie spezifischen Aktivierungsprozessen, die zu einem aggressiv- invasiven Verhalten führen [16].



**Abb. 1.3: Die Inflammation bei der rheumatoïden Arthritis**

Nach Aktivierung der postkapillären Endothelzellen exprimieren diese kostimulatorische Adhäsionmoleküle, so dass T- und B-Zellen in Richtung des inflammatorischen Reizes wandern. Die B-Zellen synthetisieren Rheumafaktoren und Kollagen-Autoantikörper, wodurch Komplement aktiviert wird. Gewebestämmige Zellen wie polymorphonukleäre Zellen, Mastzellen, Synoviozyten, dendritische Zellen und Makrophagen interagieren untereinander und mit den T-, sowie den B-Zellen mit Hilfe von Zytokinen, Peptid- und Lipidmediatoren. Diese Signalmoleküle nehmen wiederum Einfluss auf die Sekretion inflammatorischer Neuropeptide sowie Antikörper. Zuletzt steht die pathologische Proliferation der Synovia mit Knorpel- und Knochendestruktion und systemischen Manifestationen. A), B), C) = Angriffspunkte der Biologika in der chronischen Entzündung. Modifiziert nach [20]

Allerdings sind die Faktoren, die diesen autoimmunen, also selbstzerstörerischen Prozess in Gang setzen, bisher noch nicht geklärt. Die RA betrifft auch je nach Typ verschiedene Gelenkstrukturen, hat unterschiedliche Ursachen, verläuft jeweils anders und fällt unterschiedlich schwer aus.

### 1.1.3 Genetik

Wie im Kapitel 1.1.2 bereits dargestellt wurde, ist die RA eine multifaktorielle Krankheit mit immungenetischer Disposition. Die genaue Ätiologie der RA ist noch nicht bekannt, genetische Daten zeigen aber, dass eine genetische Disposition neben den Einflüssen versch. Umweltfaktoren besteht [21; 22]. Der Major Histocompatibility Complex (MHC) der Klasse II ist wesentlich an der Pathogenese der RA beteiligt und stellt den größten genetischen Risikofaktor dar [9]. Die MHC-

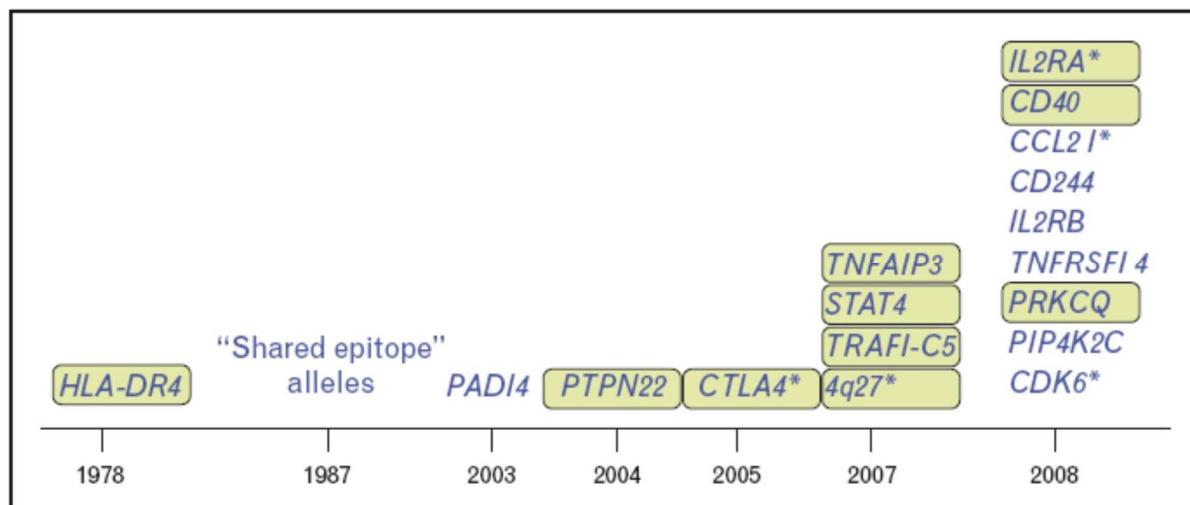
Moleküle des Menschen werden als Hauptleukozytenantigene (HLA) bezeichnet. Dabei handelt es sich um Zelloberflächenmoleküle, die eine essentielle Funktion bei der immunologischen Erkennung durch T-Helferzellen wahrnehmen. Kodiert werden MHC-Klasse II-Moleküle durch die drei Gene HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP. Jedes MHC-Molekül besteht aus einer A- und einer B-Kette. Im Falle des DR-Moleküls werden die beiden Ketten von den Genen HLA-DRA und HLA-DRB1 kodiert, von denen nur DRB1 polymorph ist. Darüber hinaus besitzt jedes Individuum zwei DRB1-Allele, von jedem Elternteil eines. Die serologische Typisierung der DR-Allele führte zu Unterscheidung von 10 verschiedenen Klassen, HLA-DR1 bis HLA-DR10. Innerhalb dieser Klassen lassen sich eine Vielzahl von Subtypen unterscheiden. So sind von DR4 bisher 50 Subtypen beschrieben, welche als HLA-DRB1\*0401 bis \*0450 bezeichnet werden. Seit längerem ist durch eine Vielzahl von Studien belegt, dass eine genetische Disposition für die RA durch einige Allele der HLA-DR-Region besteht. So ist die RA in nahezu allen Bevölkerungsgruppen mit den HLA-DR4 Subtypen DRB1\*0401, \*0404, \*0405 und \*0408 assoziiert (serologische Bezeichnung: DR4). Bereits 1976 brachte Stastny et al. den HLA-DR4-Locus mit der RA in Verbindung [23]. In einigen Bevölkerungsgruppen ist die Assoziation auch zu HLA-DR1 gezeigt worden. Eine Erklärung dafür lieferte 1987 Gregersen et al. mit der sogenannten „shared epitope“ Hypothese [24]. Sämtliche dieser RA-assoziierten HLA-DRB1-Allele kodieren in ihrer dritten hypervariablen Region an der Position 70-74 für ein Aminosäuremotiv bestehend aus fünf Aminosäuren (QKRAA, QRRAA oder RRRAA), das als „shared epitope“ oder „rheumatoïdes Epitop“ bezeichnet wird.

Der Nachweis von „shared epitopen“ ist mit einem erhöhten Risiko für die RA assoziiert und kann in der Frühphase die Diagnose der RA erleichtern. Allerdings stellt er nur einen Risikofaktor für anticitrullin-positive RA-Patienten dar [9]. Bei Vorhandensein des „shared epitope“ ist das Risiko, an RA zu erkranken, bei Trägern einer Kopie 5-10-fach und bei Trägern von zwei Kopien bis zu 30-fach erhöht. RA-Patienten ohne das „shared epitope“ zeigen eine milderende Krankheitsausprägung als Patienten mit „shared epitope“. Der genetische Beitrag des HLA-DRB1-Merkmales wird auf ca. 30% geschätzt [25; 26]. Der Mechanismus, mit dem es die Suszeptibilität für die RA erhöht, ist jedoch bisher nicht bekannt [27]. Weitere Untersuchungen zeigen zudem, dass die Ätiologie der RA nicht so einfach zu erklären ist, da man bei 5-10% aller RA-Patienten, besonders unter den Afro-Amerikanern kein für das

„rheumatoide Epitop“ kodierendes Allel gefunden hat [28; 29]. Somit liegt der Schluss nahe, dass die RA einer polygenen Beeinflussung unterliegt.

Analysen von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP-Analysen) haben außerdem gezeigt, dass nicht nur das Gen für MHC eine Rolle bei der RA spielt, sondern auch zahlreiche andere Gene außerhalb des MHC-Lokus.

Der größte Fortschritt in den letzten Jahren war die Entdeckung von Risiko-Allelen für die RA, die außerhalb des MHC-Lokus liegen. Man schätzt, dass die bekannten Risiko-Allele außerhalb des MHC-Lokus ungefähr 3-5% der genetischen Last erklären [30]. Unter diesen scheint der PTPN22 Locus derjenige mit dem stärksten Effekt zu sein [31].



**Abb. 1.4: Risiko-Allele für die RA und ihr Entdeckungsjahr**

Die Allele, die mindestens mit einer anderen zusätzlichen Autoimmunkrankheit assoziiert sind, sind gelb hinterlegt. Modifiziert nach [32]

Neuerdings wird auch immer klarer, dass der Einfluss von epigenetischen Prozessen wahrscheinlich eine genauso wichtige Rolle spielt wie der genetische Hintergrund eines Patienten. Der Begriff Epigenetik wurde von Conrad Waddington 1942 zum ersten Mal erwähnt. Unter epigenetischen Prozessen versteht man erbliche Veränderungen in der Genexpression ohne eine Veränderung der Nucleotidsequenz des Gens an sich. Das beinhaltet z.B. die Methylierung von DNA und eine post-transkriptionale Veränderung von Histonen oder anderen Chromatin-assoziierten Proteinen [33; 34].

Zudem hat man eine Gruppe von endogenen, kleinen, nicht kodierenden RNAs, welche als microRNAs bezeichnet werden, entdeckt. Schätzungen zufolge regulieren sie ungefähr 30% der menschlichen Gene [35; 37]. Es gibt immer mehr Daten, die auf eine wichtige Rolle der microRNAs in der Regulation von Immunantworten und der Entwicklung von Autoimmunität hindeuten [38; 40]. Die epigenetische Veränderung der DNA könnte also einen Schlüsselefaktor für die Pathogenese der RA darstellen.

Man muss allerdings im Auge behalten, dass neben den genetischen Faktoren auch Umweltfaktoren (Alter, Infektionen, Ernährung, Rauchen und Umweltverschmutzung) eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der RA spielen. Die Konkordanzrate für monozygote Zwillinge beträgt etwa 10-30% [41]. Diese Umweltfaktoren können ebenfalls auf den epigenetischen Hintergrund einwirken [42]. Rauchen stellt den größten bekannten Umweltrisikofaktor dar. Die schwedische Gruppe um Prof. Lars Klareskog hat nachgewiesen, dass Raucher mit „shared epitope“-Genen ein wesentlich höheres Risiko tragen, an RA zu erkranken als Nicht-Raucher mit derselben genetischen Veranlagung. So haben „shared epitope“-positive Raucher ein 7,5-fach erhöhtes Risiko an einer RA zu erkranken. Bei betroffenen Rauchern, die 2 Kopien des „shared epitope“-Allels trugen, erhöhte sich das Risiko sogar um den Faktor 15,7 [43].

Bei dem Vergleich von monozygoten Zwillingen konnte gezeigt werden, dass sehr ähnliche epigenetische Muster über die Jahre auseinanderdriften, was vermutlich durch versch. Lebensstile bewirkt wurde [44]. Allerdings ist trotz der sich häufenden experimentellen Daten die biologische Funktion der meisten microRNAs bislang nicht bekannt.

#### 1.1.4 Diagnose

Anhand einer Blutprobe lassen sich Entzündungen im Körper nachweisen. Neben den unspezifischen Werten - erhöhtes C-reaktives Protein (CRP), stark erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), Abfall des roten Blutfarbstoffs (Hämoglobin) - gehört der Nachweis des Rheumafaktors zum Standard. Unter Rheumafaktoren versteht man Autoantikörper, die gegen Epitope auf autologen IgG (Fc-Region) gerichtet sind. IgG-Rheumafaktor-Immunkomplexe können ihrerseits Immunkomplex- und Komplement-vermittelte Immunreaktionen auslösen und den Krankheitsprozess

unterhalten. Die Rheumafaktoren kommen bei ca. 80 % der Patienten vor (seropositive RA), ca. 20 % der Fälle bleiben Rheumafaktor-negativ (seronegativ). Er kann jedoch auch bei einigen anderen Krankheiten (z.B. Tuberkulose, Endokarditis lenta, chronische Virus-Hepatitis) und sogar bei Gesunden vorliegen [45]. Er ist daher nicht allzu spezifisch und für die Diagnosestellung weniger geeignet. Mehr Sicherheit in der Diagnostik bringt die Bestimmung von anderen Autoantikörpern und genetischen Markern. Dazu zählen Antikörper gegen „Zyklische citrullinierte Peptide“ (ACCP) und der Nachweis des sogenannten „shared epitope“ (Kapitel 1.1.3). Die CCP-Antikörper sind schon sehr früh im Krankheitsverlauf nachweisbar. Damit lässt sich die Diagnose rechtzeitig absichern und frühzeitig eine Therapie starten. Im Vergleich zu Rheumafaktoren besitzen Antikörper gegen CCP bei gleicher Sensitivität eine deutlich höhere Spezifität. Sie kommen bei ungefähr 2/3 aller RA-Patienten vor, ganz selten (< 2%) jedoch auch bei Gesunden oder anderen entzündlichen Erkrankungen [46]. Untersuchungen haben ergeben, dass bei der Kombination von ACCP und dem „shared epitope“ eine Spezifität von 99% [47] und bei der Kombination von ACCP und PTPN22 (Kapitel 1.1.3) eine Spezifität von 100% vorliegt, um die RA zu diagnostizieren [48].

### 1.1.5 Therapie

Ziel der antirheumatischen Therapien sind Schmerzlinderung, Entzündungshemmung und Verhinderung von Funktionsverlust und Gelenkdestruktion. Bislang ist es allerdings nicht möglich, die RA ursächlich zu therapieren und damit zu heilen, da nicht genau bekannt ist, wodurch die Erkrankung ausgelöst wird. Mit den derzeit zur Verfügung stehenden therapeutischen Verfahren ist es jedoch im Unterschied zur Situation vor 25 Jahren sehr gut möglich, das Fortschreiten der RA zu verlangsamen und die Symptome zu lindern. Allerdings ist eine komplette Remission aller Symptome nur selten erreichbar. Die medikamentöse Therapie der RA stützt sich im Wesentlichen auf symptomatische, rasch wirksame antiphlogistisch-analgetische Pharmaka und auf langsam wirkende, krankheitsmodulierende Basistherapeutika und Immunsuppressiva [49].

Bei den schmerz- und entzündungshemmenden Medikamenten, die bei der RA angewandt werden, lassen sich chemisch zwei Gruppen unterscheiden. Zu der einen Gruppe zählen unter anderem Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Paracetamol und

Ibuprofen. Da sie kein Kortisonpräparat (Steroid) enthalten, nennt man sie auch nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR). NSAR sind schwach lipophile Säuren mit einer oder mehreren aromatischen/heteroaromatischen Ringsystemen [50]. Analgetika bzw. NSAR stellen die Erstmedikation dar und dienen in der Rheumatherapie in der Regel als Zusatzpräparate, die mit anderen Medikamenten kombiniert angewandt werden. Sie üben ihre antiphlogistische und analgetische Wirkung im Wesentlichen über eine Hemmung der Prostaglandinsynthese durch eine Blockierung des Enzyms Cyclooxygenase aus [49]. Die Cyclooxygenasen sind für die Synthese von Prostaglandinen aus Arachidonsäuren verantwortlich. Die NSAR beeinflussen nicht die Ursache des Schmerzes und beeinflussen auch nicht die Entzündung. Sie haben nur die Beseitigung des Phantomschmerzes zum Ziel.

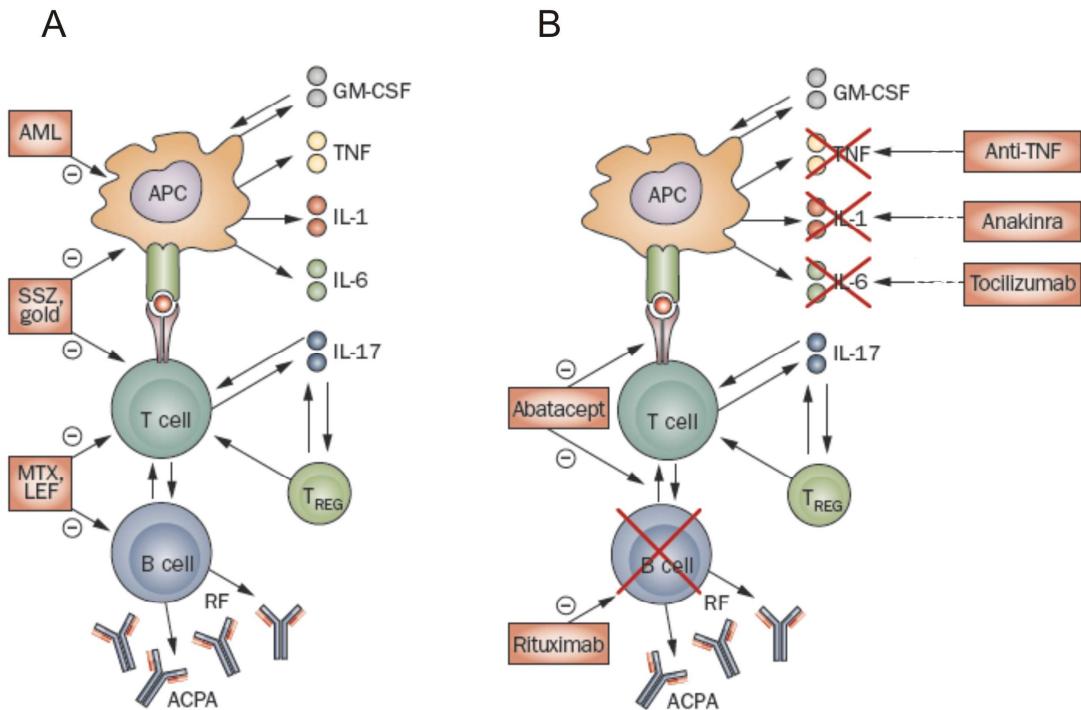
Bei nicht ausreichender Wirkung können die NSAR durch Glukokortikoide (chemisch synthetisierte Substanzen, die sich vom körpereigenen Steroidhormon Kortisol ableiten lassen) ergänzt bzw. ersetzt werden. Sie bilden die chemisch andere Gruppe der schmerz- und entzündungshemmenden Medikamente. Glukokortikoide wurden erstmals 1948 zur Behandlung der RA eingesetzt [51]. Trotz ihrer Nebenwirkungen stellen sie nach wie vor einen unverzichtbaren Bestandteil des medikamentösen Behandlungsplans der RA dar. Glukokortikoide wirken stark entzündungshemmend, indem sie entzündungsfördernde Leukozyten und Makrophagen hemmen. Sie werden in akuten Krankheitsphasen gegeben, wenn glukokortikoidfreie Entzündungshemmer nicht ausreichend wirksam sind. Auf den Verlauf der Erkrankung haben NSAR und Glukokortikoide jedoch meist keinen Einfluss [52].

Die wichtigste Bedeutung für die medikamentöse Therapie der RA aber haben die sog. Basistherapeutika, im Englischen auch als *disease modifying antirheumatic drugs* (DMARDs) bezeichnet. Sie haben keine primär schmerzlindernde Wirkung, sondern beeinflussen das Fortschreiten der Erkrankung, insbesondere sollen sie die Zerstörung von Knorpel und Knochen verhindern. Der Wirkungsmechanismus der meisten Basistherapeutika ist nach wie vor nicht gänzlich geklärt. Sie greifen bei entzündlich rheumatischen Erkrankungen direkt in den Krankheitsmechanismus ein und haben das Ziel, die Krankheit langfristig zu unterdrücken [51]. Die sog. Basistherapeutika bilden eine chemisch sehr heterogene Gruppe von Rheumamedikamenten, die zwei Eigenschaften haben: Sie entfalten ihre Wirkung erst nach mehreren Wochen oder gar Monaten, und zielen darauf ab, den

Krankheitsprozess günstig zu beeinflussen. Die Gruppe der Basistherapeutika umfasst mehr als ein Dutzend versch. Wirkstoffe, die sich hinsichtlich ihrer Wirkweise stark unterscheiden. Sie greifen direkt in den Krankheitsverlauf ein. Zu ihnen zählen unter anderem Arzneimittel mit den Wirkstoffen Methotrexat, Sulfasalazin und Chloroquin. Mit diesen Substanzen gelingt es, entzündliche Schübe zu verhindern, die Beschwerden vorübergehend verschwinden zu lassen und zu verhindern, dass die Gelenke verstießen. Ursprünglich wurden sie auch nicht als Rheumamedikamente entwickelt, sondern als Hemmsubstanzen des Immunsystems bei versch. Krebstypen. Niedrig dosiertes Methotrexat ist wegen seines raschen Wirkungseintrittes (4-8 Wochen) und seiner günstigen Wirkungs-Toxizitäts-Relation heute weltweit das meistverwendete Basistherapeutikum bei hochaktiver RA. Es hat sich weltweit als „Goldstandard“ der Basitherapie etabliert [53; 56].

Neuerdings stehen Basistherapeutika zur Verfügung, die als Biologika oder *Biologicals* bezeichnet werden. Diese Biologika wirken sehr gezielt und greifen auf molekularer Ebene in den Verlauf des Krankheitsgeschehens ein. Durch ihre Einführung im Jahr 1999 haben die therapeutischen Optionen für die RA im letzten Jahrzehnt enorm zugenommen. Die Substanzen haben sich von breiten immunomodulatorischen Substanzen zu Molekülen hin verändert, die gegen bestimmte Zytokine und Zellen gerichtet sind, welche in der Pathogenese der RA eine Rolle spielen [57].

Unter den sog. Biologischen Therapieverfahren haben v.a. Hemmstoffe, die gegen das proinflammatorische Zytokin TNF gerichtet sind, welches eine wesentliche Rolle bei der Gelenkschwellung, aber auch bei der Schädigung und Zerstörung des Gelenks, des Knorpels und des Knochens spielt, gute Wirksamkeit und eine gute Verträglichkeit gezeigt [58; 60]. Zwei Prinzipien der TNF-Blockade stehen heute zur Verfügung. Zum einen werden monoklonale Antikörper gegen TNF eingesetzt, zum anderen existiert ein löslicher humaner TNF-Rezeptor. Zu einer anderen Gruppe der Biologika gehören Interleukin-1-Rezeptorantagonisten. Außerdem zeigen Antikörper gegen B- und T-Zellen, sowie gegen den IL-6-Rezeptor in klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse [51].



**Abb. 1.5: Angriffspunkte der eingesetzten Medikamente bei der RA**

Die Gruppe der älteren Basistherapeutika (A) umfasst mehr als ein Dutzend versch. Wirkstoffe, die sich hinsichtlich ihrer Wirkweise stark unterscheiden. Sie besitzen eine breite immunomodulatorische Wirkung. Durch die Einführung von neuen Basistherapeutika (B), die als Biologika bezeichnet werden, haben die Therapieoptionen enorm zugenommen. Die Biologika wirken sehr gezielt auf das Krankheitsgeschehen ein, indem sie gegen bestimmte Zytokine und Zellen gerichtet sind. Abkürzungen: AML: Antimalaria Drogen; ACPA: anti-citrullinierte Protein/Peptid Antikörper; APC: Antigen-präsentierende Zelle; GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor; IL: Interleukin; LEF: Leflunomid; MTX: Methotrexat; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; T<sub>REG</sub>: regulatorische T-Zellen; RF: Rheumafaktor; SSZ: Sulfasalazin Modifiziert nach [61]

Ist die Erkrankung durch eine medikamentöse Therapie nicht mehr beherrschbar, muss als letztes Mittel eine Synovektomie durchgeführt werden. Dabei handelt es sich um ein operatives Verfahren, bei dem die Gelenkkinnenhaut chirurgisch entfernt wird. Nach 6-12 Wochen bildet sich ein Regenerat, welches zwar noch Zeichen einer Entzündung trägt, funktionell jedoch weitgehend normale Eigenschaften aufweist [62; 63].

## 1.2 Experimentelle Arthritismodelle

Sowohl für die Untersuchung der Pathogenese einer Krankheit, als auch für die Entwicklung von neuen Substanzen und Methoden zur Behandlung dieser Erkrankung benötigt man nicht nur Versuche *in vitro*, sondern auch Versuche *in vivo*.

Daher spielt der Tierversuch in der Biologie, besonders aber in der Medizin eine wichtige Rolle. Das Tiermodell sollte dabei die pathologischen Eigenschaften der interessierenden Krankheit möglichst optimal imitieren und zusätzlich gut reproduzierbar und einfach zu handhaben sein [64].

Grundsätzlich lassen sich die Arthritismodelle grob in Spontanarthritiden bei transgenen Tieren und in immunologisch induzierte Arthritiden unterscheiden. Zu den Spontanarthritiden gehört das K/BxN Modell, welches 1996 zum ersten Mal beschrieben wurde [65]. Bei diesem Modell entwickeln die Mäuse spontan nach ca. 27 Tagen eine starke, chronisch fortschreitende entzündliche Arthritis ohne die Zugabe eines externen Antigens [66]. Diese Mäuse besitzen einen transgenen T-Zell-Rezeptor, der das Antigen Glucose-6-phosphat-Isomerase (GPI) erkennt, welches ubiquitär exprimiert wird. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Produktion von Auto-Antikörpern gegen GPI. Die Arthritis wird ausgelöst, weil die GPI auch an der Oberfläche von Gelenkknorpel exprimiert wird und die Anti-GPI Antikörper vermutlich mit einem gelenkspezifischen Antigen kreuzreagieren.

Ein anderes Modell ist das MRL/lpr Modell [67; 68]. Diese Mäuse besitzen einen defekten Fas-Rezeptor. Über diesen Rezeptor wird normalerweise Apoptose ausgelöst. Funktioniert jedoch die Apoptose nicht mehr, so werden auch autoreaktive T-Lymphozyten im Thymus nicht mehr eliminiert. Dementsprechend sind auch autoreaktive B-Lymphozyten in der Lage zu proliferieren und große Mengen an autoreaktiven Antikörpern zu bilden.

Eine chronische Polyarthritis entwickeln auch TNF-transgene Mäuse, denen das Gen für TNF entfernt wurde und die mit einem TNF-Gen transfiziert wurden, dem die Region für die Spaltung von membrangebundenem TNF in lösliches TNF fehlt. Somit kommt es zu einer Überexpression von membrangebundenem TNF [69; 70].

Zu einer weiteren Gruppe, den immunologisch induzierten Arthritiden, zählen die Streptokokken-Wand-Arthritis, die Adjuvant-induzierte-Arthritis, die Antigen-induzierte Arthritis und die Kollagen-induzierte Arthritis. Bei der Streptokokken-Wand-Arthritis (SCW) injiziert man intraperitoneal die Zellwandbestandteile von *Streptococcus pyogenes*. Genausogut kann man aber auch Zymosan (Bestandteil der Hefe) oder LPS (Bestandteil gramnegativer Bakterien) verwenden. Bei diesem Modell macht man sich die gegen die Erreger gerichtete Immunreaktion zu Nutze. Im Rahmen der erworbenen Immunantwort können Antikörper entstehen, die mit körpereigenen

Proteinen kreuzreagieren und damit Gewebe schädigen [71; 72]. Das gleiche Prinzip wird bei der Adjuvant-induzierten Arthritis (AA) genutzt. Bei diesem Modell wird durch die Injektion von komplettem Freund Adjuvans (CFA) in die Schwanzbasis eine Polyarthritiden ausgelöst. Diese entwickelt sich aufgrund einer T-Zell-vermittelten Kreuzreaktivität zwischen den Zellwandbestandteilen der im CFA enthaltenen Mykobakterien und versch. Autoantigenen, wie Proteoglykanen oder Hitze-Schock-Proteinen [73]. Mäuse sind jedoch gegenüber der AA und der SCW relativ resistent.

Bei der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) werden die Versuchstiere mit einer subkutanen Injektion eines Gemisches aus einem Proteinantigen und einem immunstimulierenden Adjuvans immunisiert. Die Arthritis wird anschließend durch die intraartikuläre Injektion desselben Antigens in das Kniegelenk ausgelöst. Als Antigen können versch. Proteine wie methyliertes Rinderserumalbumin (mBSA) oder kationisiertes Ovalbumin dienen, die an die negativ geladene Knorpelmatrix binden können. Als Folge kommt es nicht nur zu einer massiven Expansion von z.B. mBSA-spezifischen T-Zellen und mBSA-spezifischen Immunglobulinen, sondern auch zum Auftreten von zellulärer und humoraler Autoimmunität gegen Knorpelmatrixbestandteile wie Proteoglykane und Kollagen. Die AIA geht mit einem monoartikulären Befall einher und wurde als erstes Modell der RA 1956 von Pearson beschrieben [73].

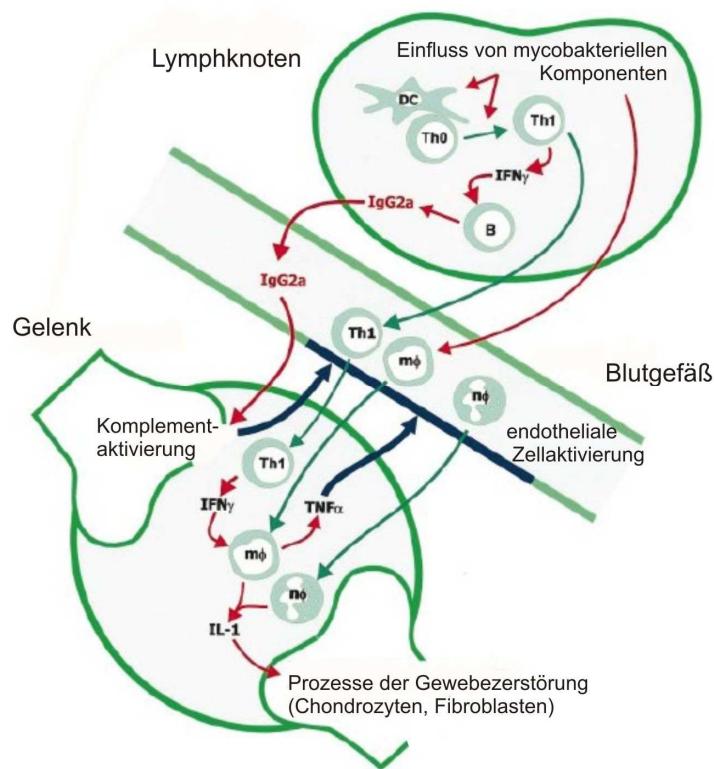
Die von diesen Arthritismodellen am häufigsten eingesetzten Modelle sind die Adjuvant-induzierte Arthritis (AIA) in Ratten, und die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen [64].

Da in dieser Arbeit ausschließlich die CIA bei Mäusen benutzt wurde, wird auf sie im Folgenden etwas näher eingegangen. Die CIA ist das am meisten verwendete Modell für die rheumatoide Arthritis und wird seit über zwei Jahrzehnten intensiv untersucht [74]. Die CIA ähnelt der menschlichen RA in vielerlei Hinsicht. Die Läsionen in den betroffenen Gelenken sind hinsichtlich der klinischen, histopathologischen und immunologischen Merkmale sehr ähnlich. Die klinischen Merkmale beinhalten Erytheme und Ödeme, während als histopathologische Merkmale Synovitis, Pannusbildung, Knorpel- und Knochenerosion zu erkennen sind. Als immunologische Merkmale treten sowohl hohe Titer an Antikörper gegen Typ II Kollagen als auch die Produktion von Rheumafaktoren [64; 75] auf.

Die CIA ist eine experimentelle autoimmune Erkrankung, die in empfänglichen Stämmen von Nagetieren (Ratte und Maus) durch eine Immunisierung mit einem Typ II-Kollagen ausgelöst bzw. hervorgerufen werden kann. Dieses ist die Hauptkomponente des Gelenkknorpels. Die Empfänglichkeit für die CIA ist bei den Nagern genauso wie bei Patienten mit RA mit den Klasse II-Molekülen des MHC-Komplexes assoziiert. Die Induktion der Arthritis erfolgt bei Mäusen durch eine intradermale Injektion von heterologem Kollagen Typ II in CFA in die Schwanzwurzel und eine anschließende Folgeinjektion drei Wochen nach der Erstinjektion mit heterologem Kollagen Typ II in IFA [12]. Sie wurde von Courtenay et al. 1980 zum ersten Mal beschrieben [76], wohingegen Wooley et al. im Jahr 1981 die genetischen Merkmale für die Empfänglichkeit der CIA analysierte [77]. Die Immunisierung mit nativem Kollagen Typ II zusammen mit Adjuvans induziert eine autoimmune Polyarthritis durch eine kreuzreaktive autoimmune Antwort gegen das Kollagen Typ II im Gelenkknorpel [74]. Die Immunantwort gegen das Typ II Kollagen ist sowohl durch eine Stimulation von Kollagen-spezifischen T-Zellen als auch durch die Produktion von hohen Antikörperspiegeln gegen das heterologe Kollagen II (Immunogen) und das autologe Kollagen II charakterisiert [78]. So entwickeln B-Zell-defiziente Mäuse mit einem genetischen Hintergrund, der sie für die CIA sehr empfänglich macht, keine CIA [79]. Einen wichtigen Hinweis für die Bedeutung von Kollagen Typ II spezifischen CD4-T-Zellen bei der Entstehung der CIA lieferte die Erkenntnis, dass die Empfänglichkeit für die CIA auf Mäuse beschränkt ist, welche bestimmte MHC-Klasse II-Allele (H-2q und H-2r) besitzen [77]. Die Blockade von T-Zellen bzw. deren Funktion verbessert z.B. den Schweregrad der Arthritis [12]. Obwohl T-Zellen eine wichtige Rolle in der Regulation und der Entwicklung einer Autoimmunantwort bei der CIA spielen, scheinen die Autoantikörper gegen das murine Kollagen II die Hauptrolle in der Immunpathogenese in diesem Modell zu spielen. Durch den passiven Transfer von Kollagen II-spezifischen T-Zellen konnte bei Mäusen keine Arthritis induziert werden [80; 81], wohingegen der passive Transfer von Immunseren aus arthritischen Mäusen in naive Mäuse eine starke Entzündung induzierte [82; 83]. Neben den T- und B-Zellen ist aber auch die Komplementaktivierung ein integraler Bestandteil der Pathogenese der CIA. Mäuse mit Verlust des Komplementfaktors C5 oder C3 waren Arthritis-resistant, obwohl sie hohe Titer an IgG2a-spezifischen Antikörpern gegen CII aufwiesen [84; 85]. Wie die meisten auf MHC-Klasse II-Molekülen basierenden Modelle bei Autoimmunität kann die Kollagen Typ II-

spezifische T-Zell-Antwort bei der CIA als Th1-Antwort klassifiziert werden. Wenn Kollagen Typ II-spezifische T-Zellen von CIA empfänglichen Mäusen mit dem Antigen *in vitro* stimuliert werden, produzieren sie große Mengen an Th1-Zytokinen wie IFN-gamma und IL-2 im Vergleich zu den Th2-Zytokinen IL-4 und IL-10. Nach einer erfolgten Immunisierung mit Kollagen Typ II konnte auch im lymphatischen Gewebe der Mäuse eine erhöhte Anzahl an Th1-Zellen identifiziert werden [86]. Die Antikörperantwort der CIA ist durch die IgG2-Subklasse dominiert. Bei der CIA sind hohe Konzentrationen an IgG2a und IgG2b vorhanden, während nur geringe Mengen an IgG1 detektierbar sind. Da beide IgG2-Subklassen zur Komplementaktivierung fähig sind, ist man zudem dazu übergegangen, die Rolle des Komplements bei der CIA zu untersuchen [87; 88].

Die vielen Gemeinsamkeiten der CIA mit der humanen RA wurden in zahlreichen Übersichtsarbeiten veröffentlicht [89; 90]. Das Zytokinmuster der CIA ist analog zur RA mit Schwerpunkt auf die proinflammatorischen Zytokine ausgerichtet. Zusätzlich können bei der CIA als auch bei der RA Autoantikörper gegen Kollagen II nachgewiesen werden. Ferner besteht wie bereits oben erwähnt, im Tiermodell als auch bei der RA eine genetische Assoziation der MHC-Klasse II-Gene [91]. Die Neigung eine CIA zu entwickeln ist bei Mäusen mit den MHC-Klasse II Allelen H-2<sup>q</sup> und H-2<sup>r</sup> eng verknüpft. Die Peptidbindungstaschen dieser murinen Genprodukte ähneln denen der humanen HLA-DR4 und HLA-DR1 Genprodukte, die beide eng mit der RA assoziiert sind. In zwei Gesichtspunkten allerdings unterscheidet sich das CIA-Modell sehr stark von der menschlichen RA. Erstens schreitet die Krankheit bei den Tiermodellen viel schneller voran als bei der menschlichen Erkrankung. Zweitens weisen Nagetiere im Verhältnis zur Gelenkentzündung einen erhöhten Knochenabbau auf [91]. Außerdem ist das Auftreten der Entzündung und Schwellung bei der CIA im Vergleich zur RA nicht zwingend symmetrisch. Jede Kombination von Pfoten und Gelenken kann betroffen sein.



**Abb. 1.6: Modell der Initierung einer CIA in  $H-2^q$  Mäusen**

Unter dem Einfluss der Mykobakterien verlagert sich die T-Zell-Antwort gegen das applizierte Kollagen Typ II von den Lymphknoten über die Blut- und Lymphgefäßse hin zu den Gelenken. Dies führt zur Differenzierung naiver T-Zellen in IFN- $\gamma$  produzierende Th1-Zellen. IFN- $\gamma$  wiederum führt zur B-Zell Isotypenänderung in aktivierte Kollagen Typ II-spezifische B-Zellen, welche IgG2a produzieren. Die IgG2a-Antikörper binden im Gelenk an Kollagen Typ II und aktivieren damit das Komplementsystem. Das aktivierte Komplementsystem erleichtert den aktivierte T-Zellen, Monozyten ( $m\phi$ ) und neutrophilen Granulozyten ( $n\phi$ ) den Austritt aus dem Blutgefäß über die Stimulation des Blutgefäßendothels. Die durch Th1-Zytokine aktivierte Makrophagen produzieren TNF, welches wiederum die Migration von Zellen in das Gelenk fördert. Modifiziert nach [92]

Es muss jedoch zur Kenntnis genommen werden, dass Tiermodelle trotz ihres unbestrittenen Wertes für die Forschung nicht die komplette Realität der menschlichen Erkrankung widerspiegeln.

## 1.3 Sympathisches Nervensystem

### 1.3.1 Anatomische Grundlagen

Vor noch ungefähr 10 Jahren wurden das Gehirn und das Immunsystem als die zwei „Supersysteme“ des menschlichen Körpers angesehen [93]. Heutzutage jedoch

werden sie nicht mehr als zwei voneinander getrennte Systeme betrachtet, sondern als zwei stark miteinander vernetzte Systeme. Zwischen diesen beiden Systemen gibt es so viele Ähnlichkeiten, dass das Immunsystem sogar von Immunologen als der sechste Sinn [94] oder das zweite Gehirn [95] bezeichnet wurde. Studien der letzten zwanzig Jahre zeigten, dass das zentrale Nervensystem nicht nur Nachrichten vom Immunsystem erhält, sondern auch die Funktion des Immunsystems moduliert [96]. Gemäß seinem räumlichen Aufbau wird das Nervensystem in ein zentrales Nervensystem (ZNS) und ein peripheres Nervensystem (PNS) eingeteilt. Zum ZNS gehören das Gehirn und das Rückenmark, zum PNS werden alle somatischen und vegetativen Nerven, einschließlich der Nervenzellansammlungen (Ganglien) gezählt. Das periphere Nervensystem (PNS) wird von Neuralleistenzellen gebildet, die aus der dorsalen Region des Neuralrohrs auswandern [97]. Funktionell unterscheidet man innerhalb des ZNS und des PNS ein somatisches und ein vegetatives (= autonomes) NS. Das somatische NS ist zuständig für die bewusste Wahrnehmung und Motorik, während das vegetative NS Organfunktionen stimuliert und kontrolliert, die unwillkürlich und unbewusst ablaufen (Herz-, Kreislauf- und Atmungsfunktion, Verdauung, Stoffwechsel und Ausscheidung sowie Wärme- und Energiehaushalt) und somit die Homöostase aufrecht erhält [98]. Das Gehirn und das Immunsystem sind sowohl über das autonome Nervensystem durch direkte neurale Einflüsse als auch über neuroendokrine Einflüsse durch die Hypophyse miteinander verbunden. In den letzten Jahren zeigte sich, dass das sympathische Nervensystem (eine wichtige Komponente des autonomen Immunsystems) alle lymphoiden Organe innerviert und dass die Katecholamine (Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems) versch. Immunparameter modulieren [93; 96; 99]. Innerhalb des vegetativen NS unterscheidet man 3 Teile: das sympathische Nervensystem (Sympathikus), das parasympathische Nervensystem (Parasympathikus) und das Darmwandnervensystem (enterisches NS). In der Regel werden Organe sowohl vom Sympathikus als auch vom Parasympathikus innerviert, wobei beide Systeme als Gegenspieler (Antagonisten) wirken. Das sympathische System ist vorwiegend auf Energiebereitstellung ausgerichtet und bereitet den Körper auf Stress vor, z.B. durch Beschleunigung des Herzschlags oder Hemmung der Verdauung. Das parasympathische System dagegen sorgt für Erholung und Energieerhaltung, z.B. durch Senkung der Herzfrequenz oder Beschleunigung der Peristaltik [100]. Sympathikus und

Parasympathikus besitzen eine efferente und eine afferente Leitungsbahn. Kennzeichnend für die Efferenzen sind zwei hintereinandergeschaltete Neuronen. Zentrale Impulse des autonomen Nervensystems gelangen nicht direkt zu Erfolgsorganen, sondern werden über eine Verbindung durch eine Zwei-Neuronen-Kette weitergeleitet. Innerhalb von Ganglien erfolgt die synaptische Umschaltung von Neuron zu Neuron. Ganglien sind wenige Millimeter große Verdickungen in Nerven oder Nervenwurzeln und beinhalten Nervenzellkörper. Man unterscheidet sensible und vegetative Ganglien. Sensible Ganglien (z.B. Spinalganglien oder Hirnnervenganglien) enthalten die Zellkörper des 1. afferenten Neurons. Vegetative Ganglien enthalten die Zellkörper des 2. efferenten Neurons (z.B. parasympathische Kopfganglien oder sympathische Grenzstrangganglien). Im Ganglion findet eine synaptische Umschaltung von vegetativen Nervenfasern (kommen aus dem Rückenmark oder aus dem Hirnstamm (präganglionärer Verlauf = 1. efferentes Neuron)), auf die Nervenzellkörper des 2. efferenten Neurons statt, dessen Nervenfasern (postganglionärer Verlauf) in die Peripherie zum Erfolgsorgan (z.B. Drüsen oder glatte Muskulatur) ziehen. Die Zellkörper des 1. sympathischen Neurons befinden sich im Seitenhorn des Rückenmarks und zwar nur zwischen dem 1. thorakalen und dem 4. lumbalen Segment. Daher ist auch die Bezeichnung „thorakolumbales System“ gebräuchlich. Die Nervenfasern verlassen das Rückenmark über die Vorderwurzel und treten über einen Verbindungsast in den sympathischen Grenzstrang ein, der aus einer Anzahl von Ganglien und Nervenfasern besteht und sich beiderseits der Wirbelsäule vom Hals bis zum Kreuzbein erstreckt. Der Grenzstrang wird auch als paravertebrale Ganglienkette bezeichnet. Das Axon des 1. Neurons (präganglionäres Neuron) ist markhaltig, das Axon des 2. Neurons (postganglionäres Neuron) weist keine Markscheide auf.

Beim parasympathischen Nervensystem dagegen liegen anatomisch gesehen die präganglionären Zellkörper im Hirnstamm sowie in den Seitenhörnern der Kreuzbeinregion des Rückenmarks, weswegen dieses System auch „kraniosakrales System“ genannt wird [98].

### **1.3.2 Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems**

Die beiden Gruppen (Sympathikus und Parasympathikus) des autonomen Nervensystems können dasselbe Organ innervieren, aber unterschiedliche

Wirkungen haben, weil ihre Neuronen unterschiedliche Neurotransmitter freisetzen. Im sympathischen Nervensystem ist der Transmitter (chemischer Überträgerstoff) des präganglionären Neurons Acetylcholin, die Transmitter des postganglionären Neurons sind Noradrenalin sowie geringere Mengen von Adrenalin (Ausnahme: Acetylcholin an den Schweißdrüsen der Haut und des Nebennierenmarks). Der chemische Transmitter des Parasympathikus ist sowohl prä- als auch postganglionär Acetylcholin [98].

Noradrenalin (NA) ist der klassische postganglionäre Neurotransmitter der sympathischen Nervenendigung [101]. Die Ausgangssubstanz für die Synthese von Noradrenalin ist Tyrosin. Es wird durch die Tyrosin-Hydroxylase in Dihydroxyphenylalanin (DOPA) konvertiert, welches der Mengen-bestimmende Schritt ist. DOPA wird dann weiterhin zu Dopamin konvertiert (durch das Enzym Dopa-Decarboxylase), welches durch einen Carrier in Vesikel transportiert wird. In den Vesikeln wird Dopamin durch das Enzym Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase in Noradrenalin umgewandelt [96; 102].

In sympathisch innervierten Erfolgsorganen existieren 2 Haupttypen von Rezeptoren: so genannte  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren. Während  $\alpha$ -Rezeptoren besonders gut auf Noradrenalin (Affinität für Rezeptor  $\alpha > \beta$ , etwa 100:1) reagieren, sprechen die  $\beta$ -Rezeptoren besonders auf Adrenalin an (Affinität für Rezeptor  $\beta > \alpha$ , etwa 100:1) [103]. Dabei kann derselbe Ligand versch. Rezeptorsubtypen binden und entgegengesetzte Effekte hervorrufen. Bisher sind 9 versch. Adrenozeptor-Subtypen bekannt: 3  $\alpha_1$  Subtypen (1A/D, 1B, 1C), 3  $\alpha_2$  Subtypen (2A, 2B, 2C) und 3  $\beta$  Subtypen [104]. Die Wirkung auf die Zelle hängt dabei maßgeblich von der Affinität des Liganden zum jeweiligen Rezeptor, von der Verfügbarkeit des Liganden und von der Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche ab. In Entzündungsgebieten wird beispielsweise der  $\beta$ -adrenerge Rezeptor vermindert exprimiert, wohingegen der  $\alpha_1$ -adrenerge Rezeptor vermehrt an der Zelloberfläche erscheint [103]. Bei hohen Konzentrationen an Noradrenalin (im Bereich von  $10^{-6}$  bis  $10^{-4}$  M) bindet es an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Adrenozeptoren, während es bei niedriger Konzentration ( $\leq 10^{-7}$  M) nur an  $\alpha$ -Adrenozeptoren bindet [105]. Neben Noradrenalin gibt es aber auch noch andere wichtige Neurotransmitter, die ebenfalls in den sympathischen Nervenendigungen lokalisiert sind. Hierbei handelt es sich z.B. um Neuropeptid Y, endogene Opioide und ATP, welches zu Adenosin umgewandelt werden kann [101; 106]. Adenosin bindet an 3 versch. Adenosinrezeptoren. Bei hohen Konzentrationen an Adenosin

(im Bereich von  $10^{-6}$  bis  $10^{-4}$  M) bindet es A1- und A2-Adenosinrezeptoren. Die Neuropeptide werden in den Somata der Neuronen der oben genannten Ganglien gebildet und entlang der Fasern axonal in die Peripherie transportiert. Ultrastrukturanalysen von sympathischen Nervenendigungen haben gezeigt, dass Noradrenalin und Neuropeptid Y in kleinen und großen Vesikeln gespeichert werden; die kleinen Vesikel enthalten entweder nur Noradrenalin oder Neuropeptid Y, während die großen Vesikel sowohl Noradrenalin als auch Neuropeptid Y enthalten [107]. Die Adrenozeptoren wirken in der überwiegenden Zahl der Fälle über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermitteln ihre Wirkung über intrazelluläre Effektoren wie beispielsweise die Adenylatcyclase (AC) und die Phospholipase C (PLC). Die G-Proteine sind Heterotrimere, da sie sich aus 3 Untereinheiten zusammensetzen; eine  $\alpha$ -, eine  $\beta$ - und eine  $\gamma$ -Untereinheit. Verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten konnte man in Säugetieren identifizieren, welche in 4 Haupt-Unterfamilien unterteilt werden:  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12}$ . Die  $G_s$ -Unterfamilie stimuliert die Adenylatcyclase,  $G_i$  dagegen inhibiert die Adenylatcyclase und  $G_q$  aktiviert die Phospholipase C. Über die  $G_{12}$ -Unterfamilie ist bisher nur wenig bekannt. Die Adrenozeptoren aktivieren direkt diejenigen G-Proteine, welche die Adenylatcyclase und die Phospholipase C stimulieren. Somit wird die Produktion von second messengern wie cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Inositol-3-Phosphat (IP3), Diacylglycerol (DAG) und  $Ca^{2+}$  induziert. Im Allgemeinen sind die  $\beta$ -Adrenozeptoren mit der  $G_s$ -Familie verbunden, was zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase führt, und somit zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. Die  $\alpha$ -1-Adrenozeptoren dagegen sind mit der  $G_q$ -Familie verbunden, was zu einer Aktivierung der Phospholipase C führt, wodurch die Konzentrationen an Inositol-3-Phosphat und Diacylglycerol erhöht werden [108; 109].

### 1.3.3 Regulation des Immunsystems

Warum das sympathische Nervensystem (SNS) bei einer Autoimmunerkrankung wie der RA von Interesse ist, wird im Folgenden an einigen Beispielen deutlich gemacht. Wie bereits in Kapitel 1.3.1 erwähnt, steht das Nervensystem in einem engen Austausch mit dem Immunsystem. Immunantworten werden auf der einen Seite durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) wie Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und anderen phagozytierenden Zellen reguliert und auf der anderen Seite durch die T-Helferzellen (Th)-Subklassen Th1 und Th2, welche

Komponenten des erworbenen Immunsystems sind [110]. Man nimmt an, dass ein Defekt im Zusammenspiel zwischen SNS und dem Immunsystem oder eine abnormale Aktivität des SNS (in beide Richtungen) zu der Pathophysiologie von einigen häufigen Krankheiten, bei denen ein Shift zu einer Th1-Antwort stattfindet, beitragen könnte. Bei der RA, der multiplen Sklerose (MS) und dem Typ I-Diabetes mellitus ist die Balance zu einer Th1 Antwort und einem Überschuss an IL-12 und TNF verschoben, während die Th2 Aktivität und die Produktion von IL-10 ungenügend ist [111; 112].

Sowohl primäre als auch sekundäre Lymphorgane werden von sympathischen Nervenfasern innerviert [113]. Zusätzlich exprimieren immunkompetente Zellen Adrenozeptoren, was darauf hindeutet, dass sie durch das SNS kontrolliert werden [114; 115]. Zudem exprimieren Osteoblasten und Osteoklasten Adrenozeptoren, was eine neuronale Regulation dieser Zellen vermuten lässt [116]. Th1-Zellen produzieren charakteristischerweise IL-1, IL-2, TNF und IFN- $\gamma$  und andere Zytokine, welche eine zelluläre Immunität hervorrufen. Th2-Zellen dagegen sezernieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, welche eine humorale Immunität hervorrufen [110; 111; 117]. Das SNS kann die Th1/Th2-Balance von einer pro-inflammatorischen (Th1) zu einer anti-inflammatoryischen (Th2) Antwort verändern [118]. Es wurde gezeigt, dass Noradrenalin sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF) inhibieren und die Produktion von anti-inflammatoryischen Zytokinen (IL-10) steigern kann [119; 120]. Nahezu alle lymphoiden Zellen exprimieren  $\beta$ -Adrenozeptoren, mit der Ausnahme von Th2-Zellen. Sie variieren nur in der Anzahl ihrer Rezeptoren. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) haben die höchste und Th-Zellen die geringste Zahl an Rezeptoren. Zytotoxische T-Zellen, B-Zellen und Monozyten liegen mit ihrer Anzahl an  $\beta$ -Adrenozeptoren dazwischen. Von Sanders et al. wurde gezeigt, dass Th1-Mauszellen, aber nicht Th2-Mauszellen,  $\beta 2$ -Adrenozeptoren exprimieren [121; 122]. Das deutet darauf hin, dass die Katecholamine systemisch die Typ 1-Zytokin-Sekretion hemmen und die Typ 2-Zytokin-Sekretion stimulieren. Bei lokalen Antworten, in spezifischen Kompartimenten, kann der Effekt unterschiedlich sein. So kann Noradrenalin über die Stimulierung von  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren die durch LPS stimulierte Produktion von TNF in Maus-Peritonealmakrophagen steigern [123]. Auf das Krankheitsgeschehen der Arthritis zeigt das SNS einen bimodalen (steigernden und hemmenden) Effekt, je nach dem wann die Sympathektomie durchgeführt wurde.

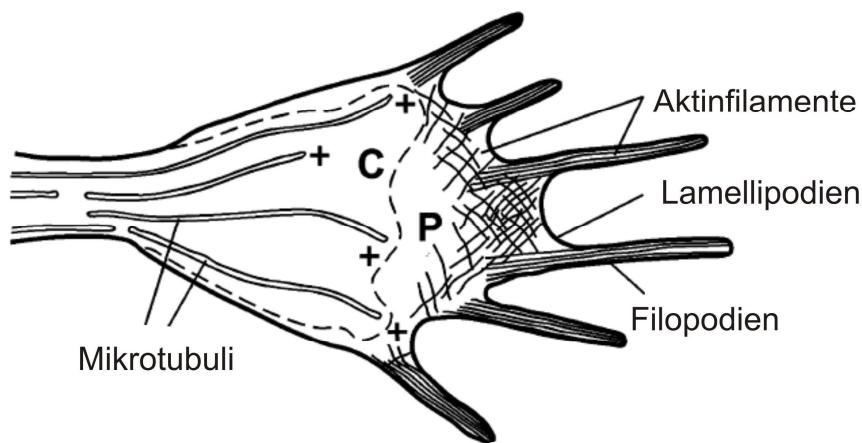
[124]. In einem Mausmodell der rheumatoiden Arthritis konnte gezeigt werden, dass das SNS in der Frühphase der Arthritis einen pro-inflammatorischen Effekt und in der Spätphase der Arthritis einen anti-inflammatorischen Effekt besitzt [124].

Noradrenalin, Neuropeptid Y und Adenosin hemmen wichtige inflammatorische Funktionen wie z.B. die Produktion von TNF durch Monozyten/Makrophagen [125; 126], die Produktion von Sauerstoffradikalen durch Neutrophile [127] und die Aktivität von natürlichen Killerzellen [128]. Das sympathische Nervensystem nimmt praktisch eine duale Rolle ein, je nachdem ob die Neurotransmitter an  $\alpha_2$ - oder  $\beta$ -Adrenozeptoren bzw. an A1- oder A2-Adenosinrezeptoren binden. Hohe Konzentrationen an diesen Neurotransmittern ( $10^{-7}$ - $10^{-5}$  M) regulieren über  $\beta$ -Adrenozeptoren, Y1 NPY-Rezeptoren oder A2-Adenosinrezeptoren viele Aspekte des angeborenen Immunsystems herunter [129]. Deshalb sollte das Vorhandensein von sympathischen Nervenfasern im Entzündungsgebiet für Patienten mit RA vorteilhaft sein [130]. Bei Patienten mit RA konnte jedoch ein deutlicher Verlust von sympathischen Nervenfasern in der Synovialmembran nachgewiesen werden [105]. Zusätzlich fand man, dass auf den Lymphozyten in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten weniger  $\beta$ -Adrenozeptoren vorkommen als auf Lymphozyten der Peripherie [129]. Dadurch kam man auf die Idee, dass eine verschlechterte Kontrolle des Immunsystems durch das SNS zu der Pathogenese der RA beitragen könnte. Die unterschiedlichen Effekte des SNS sind davon abhängig, ob eine  $\alpha_2$ -adrenerge oder eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation stattfindet. Die Stimulation von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren führt z.B. zu einer Erhöhung des TNF-Spiegels [123; 131]. Der Verlust der sympathischen Nervenfasern im Entzündungsgebiet führt zu einer Entkopplung des Synovialgewebes von der Hypothalamus-Autonomes Nervensystem-Achse (HANS-Achse). Diese Entkopplung und der Verlust von endogenen sympathischen, in hohen Konzentrationen antiinflammatorisch wirkenden Neurotransmitter könnte für RA-Patienten ungünstig sein und den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen [105].

## 1.4 Mechanismen der axonalen Wegfindung

Die Phänomene von Lenkung und Zielfindung axonalen Wachstums faszinieren Wissenschaftler seit mehr als 100 Jahren. Um ihre Ziele korrekt zu innervieren, besitzen Axone eine sehr flexible und sensitive Struktur an ihrer Spitze, die der

spanische Mediziner Ramón y Cajal schon 1890 in Hühnerembryonen identifizierte und als Wachstumskegel bezeichnete. Für die Wegfindung von Axonen schlug er einen chemotaktischen Mechanismus vor, durch den die Axone beim Auswachsen zu ihren spezifischen Zielgebieten geführt werden [132]. Wachstumskegel haben demnach eine essentielle Funktion während der Navigation von Axonen. Sie besitzen eine sehr bewegliche Struktur, die durch zwei Arten von Zytoskelettelementen bestimmt wird. In der zentralen Region des Wachstumskegels sind überwiegend Mikrotubuli lokalisiert, die bis in die Filopodien der Spitze des Wachstumskegels hineinreichen können. In der peripheren Region herrschen Aktinfilamente vor. Sie liegen in den fingerartigen Ausläufern, den Filopodien gebündelt vor und bilden in den Lamellipodien ein enges Netzwerk, wodurch die Dynamik und Beweglichkeit des Wachstumskegels gewährleistet wird [133; 134]. Der Polymerisationsstatus dieses Aktinskeletts kontrolliert die Vorwärts- oder Rückwärtsbewegung der Filopodien, wobei eine Polymerisation durch attraktive und eine Depolymerisation durch repulsive Leitmoleküle zustande kommt [135].



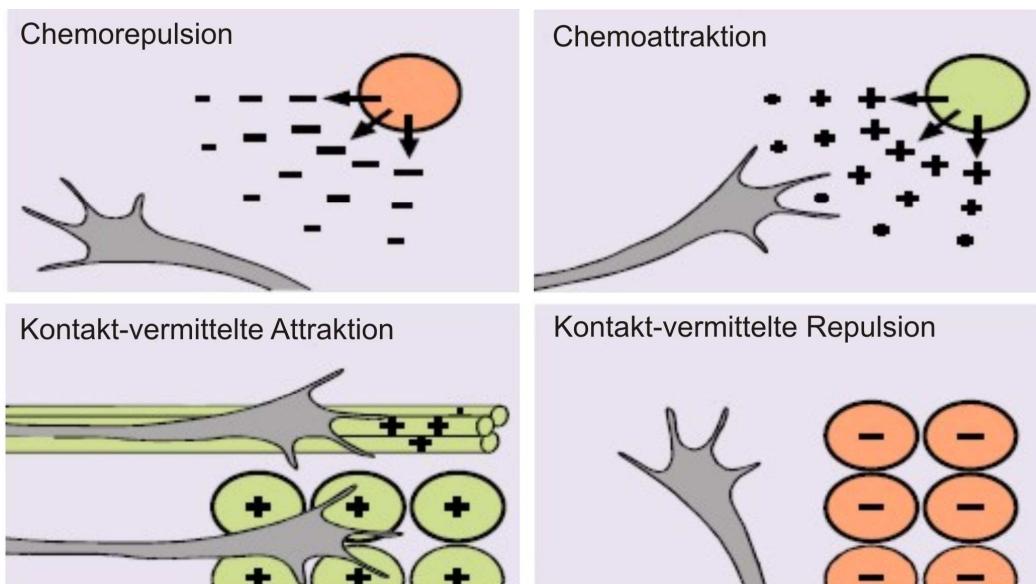
**Abb. 1.7: Der neuronale Wachstumskegel**

Zwei Typen von Zytoskelettelementen befinden sich im Wachstumskegel. In der zentralen Region (C) herrschen überwiegend Mikrotubuli vor. In der peripheren Region (P) kommen dagegen Aktinfilamente vor, die in den Filopodien feste Bündel und in den Lamellipodien ein dichtes verflochtenes Netzwerk bilden. Modifiziert nach [133]

Rezeptoren auf Axonen interagieren mit Lenkungsmolekülen (Liganden), die in der Umgebung des wachsenden Axons präsentiert werden. Die Lenkungsmoleküle werden entweder sezerniert oder sind membranständig und bewirken entweder eine

Abstoßung (Repulsion) oder eine Anziehung (Attraktion) des Wachstumskegels [136; 137].

Dabei kann die Art der Signalwirkung in Chemorepulsion, Chemoattraktion, Kontakt-abhängige Repulsion oder Kontakt-abhängige Attraktion unterteilt werden (Abb. 1.8) [137]. Diese unterschiedlichen Mechanismen werden durch permissiv oder instruktiv wirkende Proteine vermittelt. Permissive Signale bilden eine geeignete Mikroumgebung für das axonale Wachstum, ohne dass dabei eine Richtung vorgegeben wird. Zu den permissiven Proteinen zählen z.B. das Neuronale Zelladhäsions-Molekül (*neuronal cell adhesion molecule*, N-CAM), N-Cadherin oder Laminin, die entweder auf der Oberfläche von neuronalen und nicht-neuronalen Zellen oder in der extrazellulären Matrix lokalisiert sind [138]. Instruktive Signale hingegen vermitteln die Richtungsinformation für auswachsende Axone. Dabei können Axone durch Ausschluss aus bestimmten Regionen wie durch einen Korridor gelenkt werden, oder das Eindringen von Axonen in bestimmte Regionen verhindert werden [139; 141].



**Abb. 1.8: Die vier verschiedenen Mechanismen der axonalen Wegfindung**

Chemorepulsion, Kontakt-vermittelte Repulsion, Chemoattraktion und Kontakt-vermittelte Attraktion steuern Axone zu ihren Zielzellen. Repulsive Signale sind mit einem Minuszeichen und attraktive mit einem Pluszeichen gekennzeichnet. Modifiziert nach [136]

Fortschritte der vergangenen 20 Jahre führten zur Identifizierung einer Reihe dieser Wegweisermoleküle bzw. deren auf dem Wachstumskegel exprimierten Rezeptoren.

Von außerordentlicher Bedeutung dafür erwies sich der Einsatz einer Reihe von *in vitro*-Versuchssystemen zur Analyse des Richtungsverhaltens auswachsender Axone in Kombination mit Verfahren zur Proteinreinigung. In diesem Zusammenhang seien insbesondere der von Friedrich Bonhoeffer eingeführte Streifen-Versuch [142], das von Jonathan Raper und Josef Kapfhammer etablierte Versuchssystem zur Induktion des Kollapses von Wachstumskegeln [140] sowie das von Andrew Lumsden und Alun Davies zur Untersuchung der Wirkung diffusibler Faktoren entwickelte Kollagen-Co-Kultursystem für Gewebsexplantate [143] genannt.

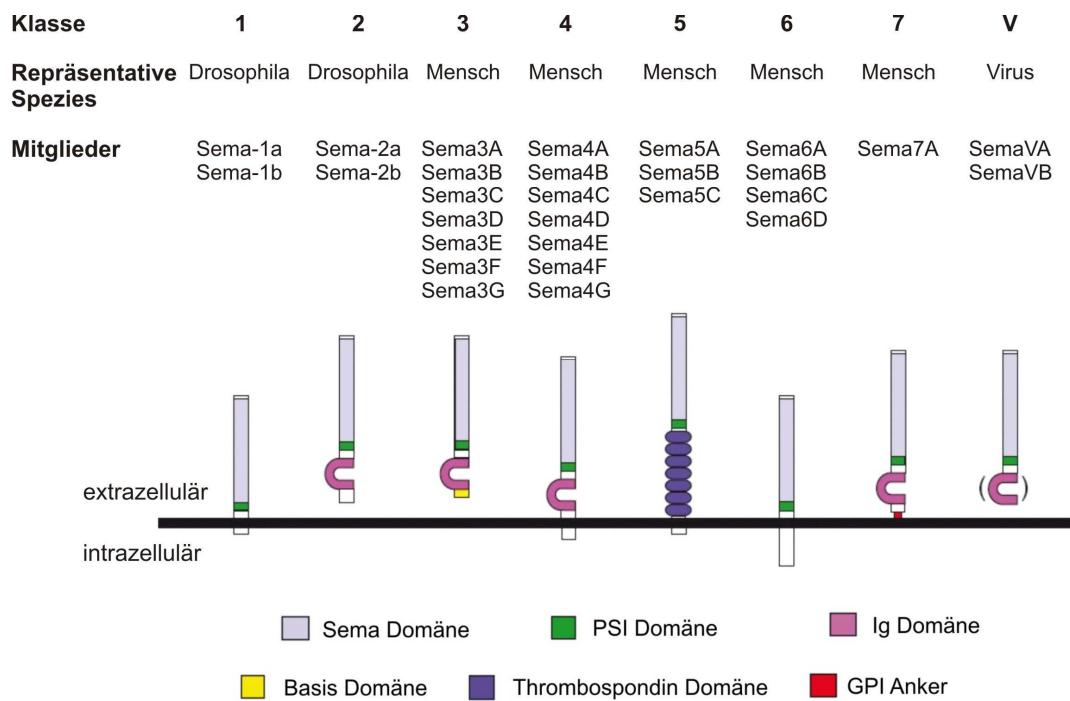
In den letzten Jahren konnten vier Proteinfamilien identifiziert werden, die eine wesentliche Rolle bei der axonalen Wegfindung spielen: die Netrine, die Ephrine, die Slit-Proteine und die Semaphorine. Alle vier Proteinfamilien sind evolutionär vom Nematoden bis zum Menschen konserviert und üben häufig eine ähnliche Funktion während der Wegfindung von Axonen aus. Einige der Faktoren können je nach Art des auf dem Wachstumskegel vorkommenden Rezeptors sowohl attraktiv als auch repulsiv wirken [137]. Im Gegensatz zur Identifizierung zahlreicher an der Lenkung beteiligter extrazellulärer Faktoren und deren Rezeptoren auf dem Wachstumskegel sind die Mechanismen der intrazellulären Signaltransduktion während des Axonenwachstums gegenwärtig nur unvollständig verstanden. Dabei hängt ihre attraktive und repulsive Wirkung nicht nur allein von der Expression des jeweiligen Rezeptors ab, sondern auch von der intrazellulären Konzentration zyklischer Nukleotide (cGMP oder cAMP) im Wachstumskegel [144; 145].

#### 1.4.1 Semaphorine

Die Semaphorine repräsentieren die größte Proteinfamilie von Signalmolekülen, die an der axonalen Wegfindung beteiligt ist. Die Familie besteht aus bisher mindestens 30 identifizierten Proteinen, die anhand der Sequenzhomologien ihrer Sema-Domäne und einem Klasse-spezifischen C-Terminus in 8 Klassen unterteilt werden können (Abb. 1.9) [146]. Die Klassen 1 und 2 werden allein in Invertebraten gefunden, während die Klassen 3 bis 7 in Vertebraten repräsentiert sind. Die viralen Semaphorine bilden die achte Klasse der Genfamilie [146; 147]. Die Semaphorin-Familie beinhaltet sowohl sezernierte (Klasse 2 und 3) als auch membranständige Mitglieder, die durch eine Transmembrandomäne (Klasse 1, 4, 5 und 6) oder mit einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker (Klasse 7) in der Plasmamembran

verankert sind [148]. Die Funktion der membrangebundenen Semaphorine ist bisher noch weitgehend unklar.

Charakteristisch für die Semaphorine ist eine 500 Aminosäuren lange extrazelluläre Semaphorindomäne (Abb. 1.9), die in Invertebraten und Vertebraten konserviert ist [149; 150]. Diese Sema-Domäne enthält neben konservierten Sequenzmotiven eine kleine cysteinreiche Domäne (bestehend aus 14 hochkonservierten Cystein-Resten) und eine potentielle N-Glykolisierungsstelle. Die cysteinreiche Domäne wird als PSI-Domäne (Plexin/Semaphorin/Integrin-Domäne) bezeichnet. Die extrazelluläre Domäne der meisten Semaphorine beinhaltet zudem eine Ig-ähnliche Domäne (Klassen 2-4 und 7), auf die ein Klassen-spezifischer C-Terminus folgt [147]. Die carboxyterminale Domäne der meisten Semaphorine besteht aus einer Immunglobulin-ähnlichen Domäne (Klasse 2-4 und 7), gefolgt von einem Klassen-spezifischen carboxy-terminalen Ende. Die carboxy-terminale Domäne der Klasse 5 Semaphorine enthält sieben Typ-1 Thrombospondin-Kassetten.



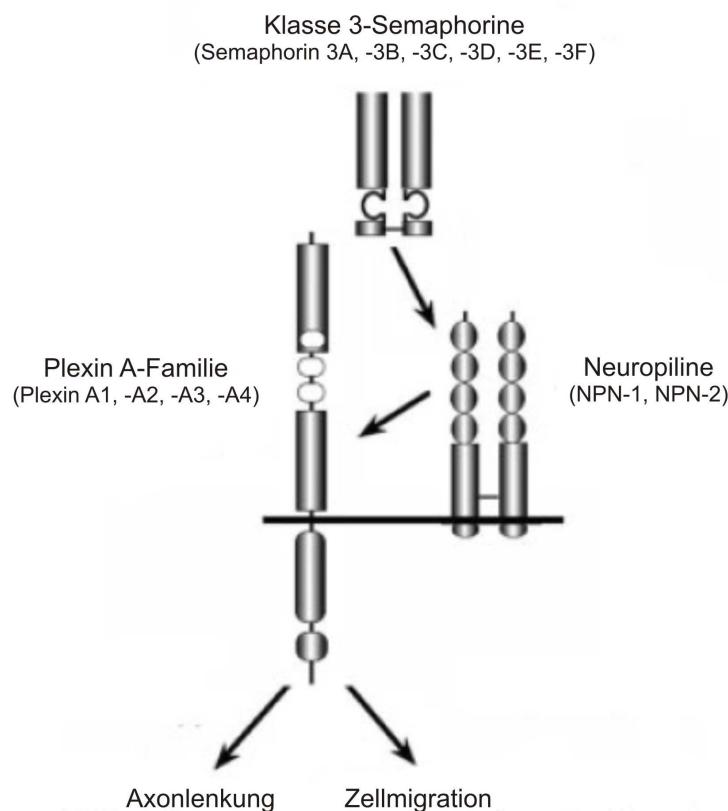
**Abb. 1.9: Mitglieder der Semaphorin Familie**

Schematische Darstellung der acht unterschiedlichen Semaphorin-Klassen: Die Klassen 1 und 2 enthalten Mitglieder der Invertebraten, die Klassen 3-7 Proteine der Vertebraten, Klasse 5 enthält sowohl Mitglieder von Invertebraten als auch von Vertebraten und Klasse V virale Proteine. Semaphorine kommen als sezernierte (Klassen 2, 3 und V) oder als membrangebundene Proteine (Klassen 1 und 4-7) vor. Alle Proteine zeigen mit ihrem Amino-Ende nach oben. Modifiziert nach [151]

Die physiologische Funktion der Semaphorine ist am besten in der Entwicklung des Nervensystems untersucht, wo sie an der Steuerung und Wegfindung von Axonen und Dendriten, der axonalen Faszikulation und der Zellmigration beteiligt sind. Fast alle Semaphorine der Vertebraten zeigen ein komplexes und dynamisches Expressionsmuster im embryonalen und adulten peripheren und zentralen Nervensystem. Die meisten fungieren sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten als abstoßende Leitmoleküle [149; 152]. Einige haben erwiesenermaßen jedoch auch attraktive Wirkung auf Neurone [146; 153], wobei dieser Effekt von dem jeweiligen Aktivierungsstatus der Wachstumskolben abhängig zu sein scheint [135]. Bisher wurde nur die Funktion der sezernierten Klasse 3-Semaphorine genauer untersucht. Klasse 3-Semaphorine haben *in vitro* einen starken repulsiven Effekt auf eine Vielzahl von Axone, wie z.B. Axone sympathischer, sensibler und motorischer Neurone [147; 152; 154]. Semaphorin 3A (ursprünglich als Collapsin 1 bezeichnet) war das erste chemorepulsiv wirkende Protein, das molekular charakterisiert wurde. Es wurde in Membranpräparationen von embryonalem oder adulten Gehirnen von Hühnern identifiziert [140; 155]. Die Klasse 3-Semaphorine werden als Proproteine synthetisiert und erlangen ihre vollständige Aktivität erst durch eine proteolytische Spaltung, die durch Furin oder eine verwandte Endoprotease katalysiert wird. Alle Semaphorine der Klasse 3 bilden durch Disulfidbrücken kovalent verbundene Homodimere, deren Ausbildung für die repulsive Wirkung essentiell ist [147; 156]. *In vitro* wirkt Semaphorin 3A als repulsives Signal auf sensible Axone [157; 158]. Für insgesamt drei Semaphorine, Semaphorin 3A, Semaphorin 3C und Semaphorin 3F, die alle aus der gleichen Klasse von sezernierten Semaphorinen stammen, wurden Rezeptoren im Nervensystem der Säuger beschrieben [159; 160]. Genetische Analysen der Semaphorine und ihrer Rezeptoren zeigten, dass diese Proteine auch wesentliche Funktionen außerhalb des Nervensystems übernehmen, z.B. während der Angiogenese und in der Immunabwehr. So leiden Semaphorin 3A-defiziente Mäusen an einer Hypertrophie der rechten Herzkammer [161]. In Semaphorin 3C-Mutanten konnten starke kardiovaskuläre Defekte festgestellt werden, die auf einer fehlerhaften Separierung des kardialen Bereiches des Blutaustritts zurückzuführen sind [162]. Für die Beteiligung der Semaphorine in der Immunabwehr spricht, dass Semaphorin 4D auf der Zelloberfläche von aktivierten T-Helferzellen exprimiert wird und an der Aggregation und Aktivierung von B-Zellen beteiligt ist [163].

### 1.4.2 Neuropiline

Den Semaphorinen stehen als Rezeptoren die Gruppe der Neuropiline und Plexine gegenüber. Die repulsive Wirkung der Klasse 3-Semaphorine wird durch einen Rezeptorkomplex vermittelt, der Neuropilin als Liganden-bindende Untereinheit und Mitglieder der Typ-A Plexine als Signal-transduzierende Untereinheit enthält (Abb. 1.10) [137; 164; 165].

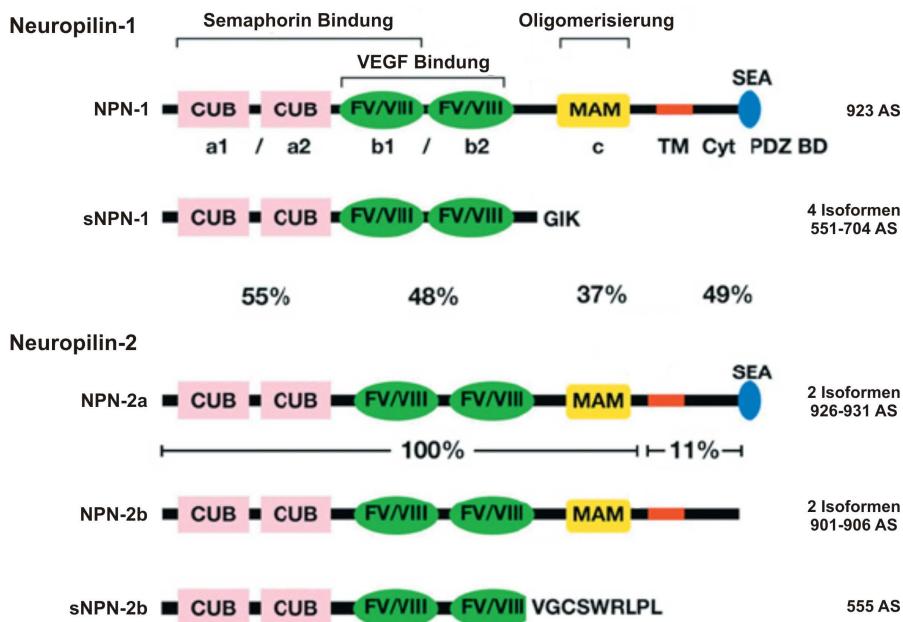


**Abb. 1.10: Der Signalmechanismus der Klasse 3-Semaphorine**

Zwei versch. Neuropiline (NPN-1 und NPN-2) bilden mit vier versch. Plexinen (Plexin A1, -A2, -A3, -A4) den Rezeptorkomplex um die Signale der Semaphorine weiterzuleiten und auf diese Weise die Lenkung von Axonen und die neuronale Zellmigration und –adhäsion zu regulieren. Modifiziert nach [166]

Neuropilin-1 (NPN-1) und das nah verwandte Neuropilin-2 (NPN-2) weisen weitgehend komplementäre Expressionsmuster in neuronalen und nicht-neuronalen Geweben auf. Sie binden alle getesteten Klasse 3-Semaphorine, unterscheiden sich aber in den Affinitäten für die einzelnen Mitglieder [148; 167]. Semaphorin 3A wirkt repulsiv auf NPN-1-positive Neuriten, wie sensible oder sympathische Axone, während Semaphorin 3C oder Semaphorin 3F nur Effekte auf sympathische Neurone haben, die zusätzlich auch NPN-2 exprimieren [149; 150; 157; 168]. Versuche mit

blockierenden Antikörpern und „Knock-out“ Mäusen zeigten, dass die repulsive Wirkung von Semaphorin 3A durch Homooligomere aus NPN-1 vermittelt wird. Dagegen wird die Repulsivität von Semaphorin 3F durch Homooligomere aus NPN-2 vermittelt während NPN-1/NPN-2-Heterodimere als Rezeptor für Semaphorin 3C dienen [168; 169]. Die Neuropilin sind aber nur für die Bindung der Semaphorine verantwortlich. Sie sind nicht an der Signaltransduktion beteiligt. So zeigte eine Deletion der zytoplasmatischen Domäne von NPN-1, dass diese für die Weiterleitung der durch Semaphorin 3A aktivierten Signalkaskade nicht erforderlich ist [170]. Die Neuropilin sind ca. 120 - 130 kDa große Nicht-Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, die eine ähnliche Struktur ihrer Domänen und eine Homologie von 45% in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen. Bei den Menschen ist das NPN-1 Gen auf Chromosom 10 und das NPN-2 Gen auf Chromosom 2 lokalisiert [160; 171]. Die Neuropilin sind hoch konserviert und bestehen extrazellulär aus drei Domänen (Abb. 1.11): zwei CUB (a1/a2) -Domänen (homolog zu den Komplement-bindenden Faktoren C1s/C1r, Uegf, BMPI), zwei Faktor V/VIII (b1/b2) – Domänen (homolog zu den Blutkoagulationsfaktoren V/VIII)- Domänen (b1/b2) und einer MAM (c) (Meprin, A5 Antigen, Rezeptor Tyrosin Phosphatase  $\mu$ ) - Domäne [159; 160; 172]. Die extrazelluläre Domäne ist im Vergleich zur kurzen zytoplasmatischen Domäne, die nur aus 44 bzw 43 Aminosäuren besteht, sehr lang. Die kurze zytoplasmatische Domäne weist keinerlei Homologie zu bekannten Signaltransduktionsdomänen auf. Die beiden CUB-Domänen (a1/a2), als auch die Faktor V/VIII Domäne (b1) sind für die Bindung der Semaphorine essentiell [168; 170; 173; 174]. Die MAM-Domäne (c) ist für die Homodimerisierung bzw. Heterodimerisierung der Neuropilin entscheidend [175]. Zusätzlich zu den membrangebundenen Neuropilinen gibt es noch lösliche Neuropilin, denen die MAM-Domäne, die Transmembran-Domäne und die zytoplasmatische Domäne fehlt [171; 176]. Membrangebundenes NPN-2 existiert in zwei Haupt-Isoformen, NPN-2a und NPN-2b, die in ihrer extracytoplasmatischen Domäne identisch sind und sich nur in ihren transmembranösen- und zytoplasmatischen Domänen unterscheiden.



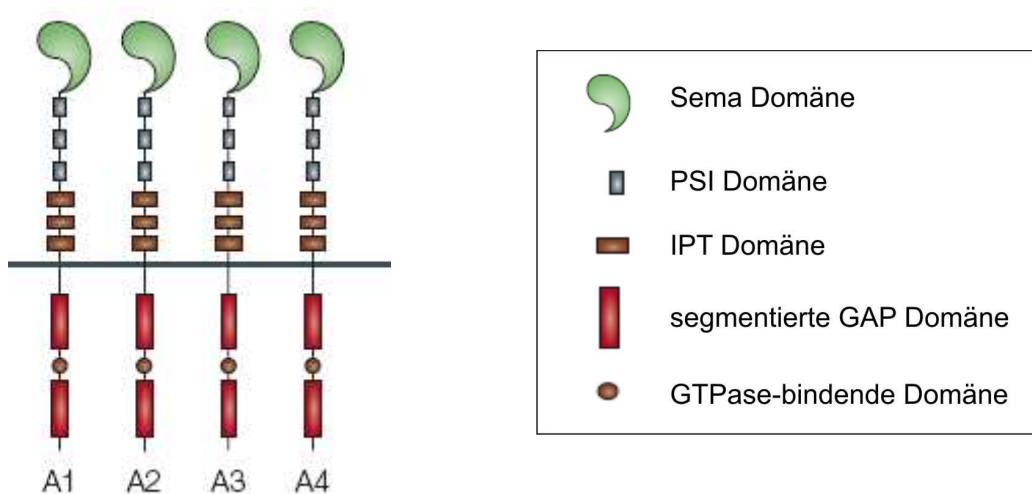
**Abb. 1.11: Die Gen-Organisation und Proteinstruktur der Neuropiline**

Die Gene für beide Neuropiline bestehen aus 17 Exons. Durch alternatives Spleißen werden versch. Isoformen generiert. Beim NPN-1 gibt es nur eine membrangebundene Isoform, aber vier versch. lösliche Isoformen. Beim NPN-2 dagegen gibt es zwei Haupt-Isoformen, NPN-2a und NPN-2b, von welchen wiederum jeweils 2 Isoformen existieren. Beim löslichen NPN-2 ist nur eine Isoform bekannt. TM: Transmembrandomäne, Cyt: zytoplasmatische Domäne, die eine PDZ-bindende Domäne mit der Sequenz SEA enthält. Modifiziert nach [177]

Die Neuropiline sind aber nicht nur ein Bestandteil des Semaphorin-Rezeptors, sondern üben auch eine Funktion im vaskulären System aus. In den letzten Jahren zeigte sich, dass die Entwicklung des Nerven- und des vaskulären Systems eng miteinander verbunden sind. Beide Systeme sind stark hierarchisch organisiert und beeinflussen teilweise gegenseitig ihre Morphogenese [178]. So sterben NPN-1-defiziente Mäuse im Embryonalalter von Tag 14 an Defekten der Herzgefäße und des Nervensystems [179; 180]. Obwohl NPN-2-defiziente Mäuse lebensfähig sind, zeigen sie während der Entwicklung keine oder nur eine kleine Anzahl von kleinen Lymphgefäßen und -kapillaren [181]. NPN-1 wurde neben den VEGF-Rezeptoren-1 und VEGF-Rezeptoren-2 als Rezeptor für VEGF165, welches eine von drei versch. Isoformen des VEGF (vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor) darstellt, identifiziert [182]. Die Bindungsstellen von VEGF165 und Semaphorin 3A liegen in der b1/2-Domäne von NPN-1 und sind überlappend, so dass VEGF165 und Semaphorin 3A um diese Bindungsstelle kompetitieren. Des Weiteren reguliert das Gleichgewicht von Semaphorin 3A und VEGF165 die Migration und Apoptose von neuronalen Vorläuferzellen [183].

### 1.4.3 Plexine

Alle Semaphorine der Klasse 3 mit Ausnahme von Semaphorin 3E benötigen für die Bindung den Rezeptor Neuropilin (Kapitel 1.4.2). Die Signaltransduktion der Klasse 3-Semaphorine wird jedoch durch Plexine vermittelt, die eine konservierte zytoplasmatische Domäne besitzen. In Vertebraten konnten bisher neun unterschiedliche Plexine identifiziert werden, die in vier Klassen, A-D, eingeteilt werden [172; 184; 185]. Die Ektodomäne aller Plexine enthält eine Sema-Domäne, drei PSI (Plexin, Semaphorin, Integrin) - Domänen und drei IPT (Ig-ähnlich, Plexin, Transkriptionsfaktoren) - Domänen. Die intrazelluläre Domäne besteht aus einer segmentierten GAP (GTPase-aktivierendes Protein) - Domäne mit einer GTPase-bindenden Domäne.



**Abb. 1.12: Die Familie der Typ-A Plexine**

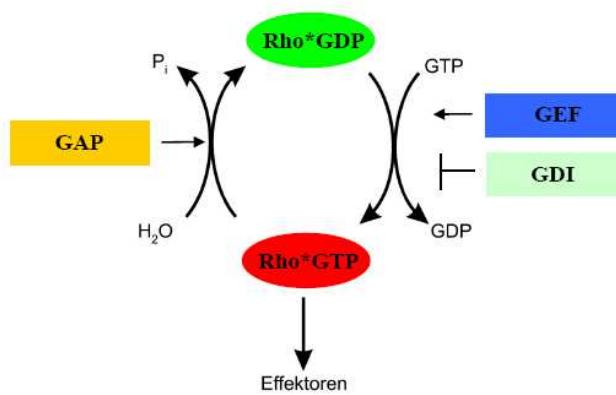
Die Typ-A Plexine bilden zusammen mit den Neuropilinen einen Rezeptorkomplex für sezernierte Semaphorine. Innerhalb dieses Komplexes stellen sie die Signal-transduzierende Untereinheit dar. Modifiziert nach [186]

Typ-A Plexine und Neuropiline bilden unabhängig von einer Ligandenbindung einen stabilen Komplex [164; 165; 185]. Analysen von Plexin A3 und Plexin A3/Plexin A4 „Knock-out“ Mäusen bestätigten, dass Plexin A3 als Rezeptoruntereinheit an der Vermittlung der Effekte von Semaphorin 3F beteiligt ist [184] und die Effekte von Semaphorin 3A durch Plexin A4 vermittelt werden [187]. *In vitro* Experimente zeigten, dass Semaphorin 3C sowohl NPN-1/Plexin A2- als auch NPN-2/Plexin A2-Komplexe erkennen kann [188]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass

Plexine als Signal-transduzierende Rezeptorkomponenten der sezernierten und membranständigen Semaphorine dienen.

#### 1.4.4 Die Rolle von GTPasen im Plexin-vermittelten Signalweg

Das Verhalten des Wachstumskegels wird wie bereits in 1.4 erwähnt durch die Dynamik des Zytoskeletts bestimmt. Allerdings ist über die intrazelluläre Signaltransduktion der Semaphorine über die Plexine bisher nur wenig bekannt. Die bisherigen Untersuchungen sind in dieser Hinsicht leider auch fast nur auf Semaphorin 3A beschränkt und beschäftigen sich nur sehr wenig mit den für diese Arbeit interessanten Semaphorinen 3C und -3F. Der molekulare Mechanismus der Signaltransduktion kann auf die Rho-Familie kleiner GTPasen zurückgeführt werden, die als eine Art Schalter zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen Status und einem aktiven GTP-gebundenen Status fungieren [189; 190]. Ihre Aktivität wird von zwei entgegengesetzten Mechanismen reguliert, den GEFs (Guanin Nukleotidaustauschfaktoren) und den GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs). Dabei aktivieren die GEFs die GTPasen, indem sie den Austausch von GDP zu GTP katalysieren [191], während GAPs die sehr langsame intrinsische GTP-Hydrolyse der GTPasen um das  $10^5$ -fache beschleunigen und durch den Austausch von GTP zu GDP das G-Protein inaktivieren [192]. Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) hemmen den Austausch von GDP durch GTP und somit die Aktivierung der GTPasen.

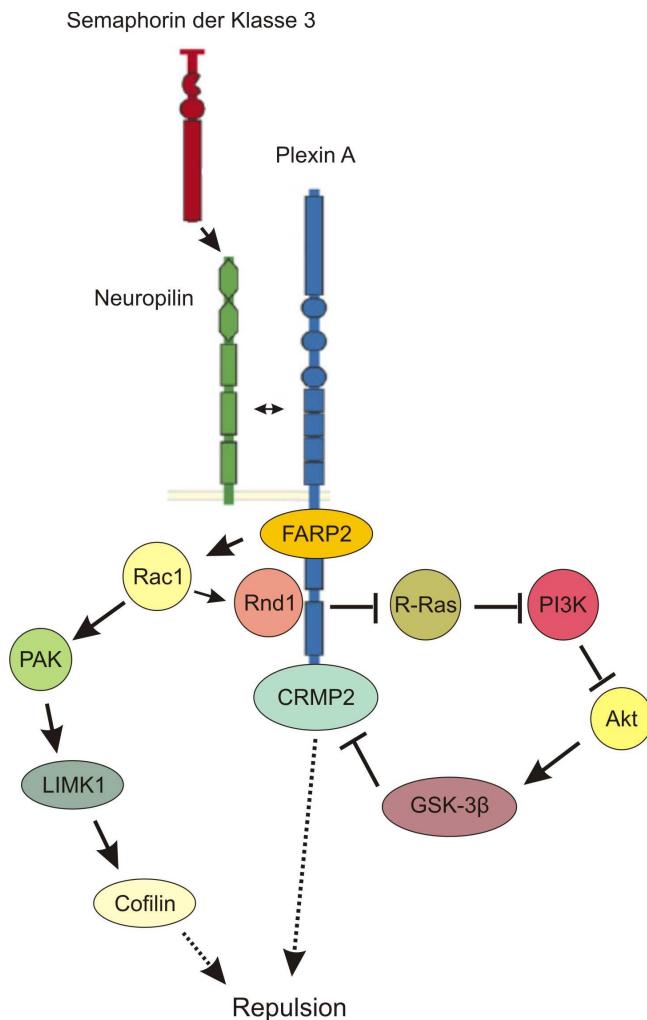


**Abb. 1.13: Regulation von Rho-GTPasen**

Rho-GTPasen wechseln zwischen einem GDP-gebundenem, inaktiven und einem GTP-gebundenem aktiven Zustand. Dabei werden sie durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) und durch Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) reguliert. Modifiziert nach [193]

Die intrazellulären Domänen der Plexine sind hoch konserviert und können mit zahlreichen intrazellulären Signalvermittlern interagieren und auf diese Weise mehrere Signalwege als Antwort auf eine Semaphorin-Stimulation aktivieren [186]. Sie enthalten GAP-ähnliche Motive, die mit dem monomeren G-Protein Ras interagieren und dessen Aktivität herunterregulieren können (Abb. 1.14) [194]. Die Abnahme von aktivem R-Ras führt zur Inaktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Die Inhibierung des PI3K-Akt-Signalweges aktiviert die Glykogen Synthase Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), welche wiederum zu einer Phosphorylierung und damit Inaktivierung des *Collapsin response mediator protein 2* (CRMP2) führt. Die durch GSK-3 $\beta$  vermittelte Phosphorylierung von CRMP2 ist von einem Fyn-Cdk5 (*Cyclin-dependent kinase 5*) - Komplex abhängig. Dieser Mechanismus führt zur Destabilisierung von Mikrotubuli.

Eine andere intrazelluläre Domäne der Plexine interagiert mit der Rho-Familie der GTPasen wie Rac1 und Rnd [189; 195]. Die GAP-Aktivität von Plexinen wird durch eine FARP2 (Rac-GEF) vermittelte Aktivierung von Rac1 reguliert. Aktives Rac1 ermöglicht über eine Verbindung mit Rnd1 (einer kleinen GTPase) die Aktivierung von PAK (*p21-associated protein*), LIM-Kinase und Cofilin. Das aktivierte Cofilin induziert Aktin-Depolymerisation und ist für die Retraktion der Filopodien und des Wachstumskegels verantwortlich [196; 197].



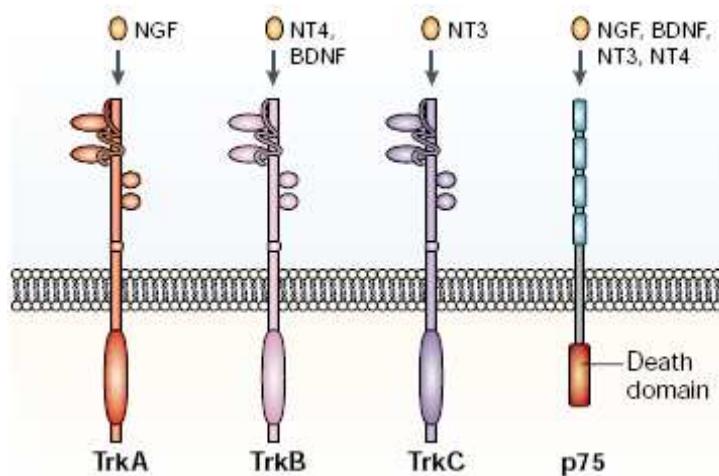
**Abb. 1.14: Vereinfachte Darstellung der durch Semaphorine induzierten Signalkaskade**

Auf eine Semaphorin-Stimulation hin können mehrere Signalwege aktiviert werden. Die Plexine enthalten GAP-ähnliche Motive, die die Aktivität des monomeren G-Proteins Ras herunterregulieren können. Eine andere intrazelluläre Domäne der Plexine interagiert mit der Rho-Familie der GTPasen. Abkürzungen: CDK5: Cyclin-abhängige Kinase 5; CRMP2: Collapsin response mediator protein 2; PAK: p21-associated protein; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; Rnd1: Rho Familie GTPase 1  
Modifiziert nach [198]

#### 1.4.5 Neurotrophine

Die Neurotrophine (ca. 13-16 kDa) sind eine kleine Familie von neurotrophen Faktoren, die versch. Aspekte (neuronales Überleben, Wachstum und Regeneration) des sich entwickelnden und ausgewachsenen Nervensystems regulieren. Die Neurotrophine werden anfangs als Pro-Neurotrophine synthetisiert und dann durch Furin oder Pro-Convertasen in die reifen Neurotrophine gespalten [199]. Über die Sezernierung von neurotrophen Faktoren bestimmen Zielgewebe u.a. den Umfang ihrer Innervierung. Der Nervenwachstumsfaktor (NGF) war das erste identifizierte

Mitglied der Neurotrophin-Familie und wurde bereits vor mehr als 40 Jahren entdeckt [200]. Neben dem NGF gehören auch noch der *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), das Neurotrophin-3 (NT3) und das Neurotrophin-4/5 (NT4/5) zu der Neurotrophin-Familie [201; 202]. Die wichtigsten Neurotrophinrezeptoren gehören zur Familie der Tyrosinkinasen (Trk) (Abb. 1.15), die typischerweise liganden-abhängig dimerisiert werden und deren intrazelluläre Domäne dann durch Rekrutierung von Effektor- und Adapterproteinen das Aktinskelett der Zelle beeinflusst. Durch die Phosphorylierung der Phospholipase C (PLC) werden Lipide zu Diacylglycerol und Inositol-3-Phosphat (IP3) umgewandelt, was zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration führt. Außerdem werden versch. Proteinkinase C-Isoformen, MAP Kinasen und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3 K) aktiviert.



**Abb. 1.15: Die Neurotrophine und ihre Rezeptoren**

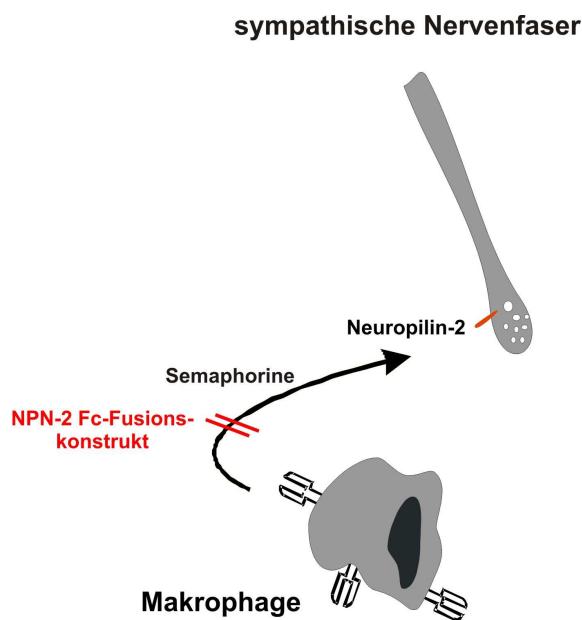
Die Neurotrophine binden selektiv an versch. Trk-Rezeptoren. Dagegen binden alle Neurotrophine an den p75 Rezeptor. Die Bindung der Neurotrophine resultiert in einer Dimerisierung des Rezeptors. Nach [203]

Jedes der vier Neurotrophine der Säugetiere bindet an einen oder mehrere Rezeptoren der Trk-Familie (Abb. 1.15). So bindet NGF an die Tyrosinkinase A (TrkA), wohingegen BDNF und Neurotrophin-4/5 an die Tyrosinkinase B (TrkB) und Neurotrophin-3 an die Tyrosinkinase C (TrkC) binden [201; 202; 204]. Die Hauptsignalwege, die durch aktivierte Trks in Neuronen initiiert werden sind der Raf-MAPK- und der PI3K/Akt- Signalweg [205]. NGF ist dabei entscheidend für die sympathische Innervation von Zielgebieten von Neuronen, deren Zellkörper in den

paravertebralen und prevertebralen sympathischen Ganglien liegen [206]. BDNF und NT-4 können durch die Aktivierung des p75-Rezeptors Apoptose in sympathischen Neuronen auslösen. Zusätzlich kann jedes Mitglied der Neurotrophin-Familie an den Rezeptor p75 binden, jedoch nur mit geringer Affinität [207; 208]. Jeder der Neurotrophin-Rezeptoren wird in Membranvesikeln verpackt und retrograd durch axonalen Transport zum Soma transportiert, wo die gerade beschriebenen Signalwege aktiviert werden. Dabei ist der Transport von NGF zu 80-90% von der TrkA abhängig, wohingegen der Transport von BDNF, NT-3 und NT-4/5 fast vollständig von dem p75-Rezeptor abhängt [209; 211].

## 1.5 Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle des sympathischen Nervensystems (SNS) bei der RA. Sowohl bei Patienten, die an der RA leiden, als auch bei der experimentellen Arthritis im Tiermodell konnte ein Verlust von sympathischen Nervenfasern im Entzündungsgebiet nachgewiesen werden. Diese Tatsache könnte einen Chronifizierungsfaktor der RA darstellen, da die Neurotransmitter des SNS in hohen Konzentrationen antiinflammatorisch wirken. In dieser Arbeit sollte eine kausale Beziehung zwischen Nervenrepulsion und Arthritisverlauf hergestellt werden. Mögliche Faktoren, die für das Verschwinden der sympathischen Nervenfasern verantwortlich sein könnten, sollten identifiziert und untersucht werden. Dabei handelte es sich um Nervenrepulsionsfaktoren (Semaphorine) und deren Rezeptoren (Neuropilin). Für deren Untersuchung sollte ein geeignetes Testsystem entwickelt werden. Die zugrunde liegende Idee war, dass durch die Blockade der Signaltransduktion durch ein appliziertes NPN-2 Fc-Fusionskonstrukt (NPN-2fc) die Bindung der Semaphorine an ihren Rezeptor (NPN-2) auf der Oberfläche der sympathischen Nervenfasern verhindert wird. Auf diese Weise versprach man sich eine Erhöhung der Nervendichtheit des SNS im Entzündungsgebiet, welche im Krankheitsprozess zu einer Verminderung der Arthritis führen sollte (Abb. 1.16).



**Abb. 1.16: Idee der Arbeit**

Die Semaphorine sollen durch ein appliziertes NPN-2 Fc-Fusionskonstrukt abgefangen werden, damit sie nicht mehr an den NPN-2-Rezeptor auf den sympathischen Nervenendigungen binden können.

## 2 Material

### 2.1 Laborgeräte

Absorptionsspektrometer (für 96-well Platten, ELISA-Reader)	MWG Biotech, Denkendorf
Analysenwaage Sartorius analytic A120S	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Technomara, Fernwald
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer Coulter® EPICS® X - MCL™	Beckman Coulter, Krefeld
Durchlichtmikroskop	E. Leitz, Wetzlar
Econo-Säule	Bio-Rad, München
Elektrophoreseapparaturen	Biometra, Göttingen; Bio-Rad, München
Entwicklerautomat Curix 60	Agfa, Köln
Fluorezenzmikroskop	Leica Microsystems, Nussloch
Fluorezenzmikroskop Axiovert 200 MAT	Zeiss, Jena
Kryostat (CM 3050 S)	Leica Microsystems, Nussloch
Kühl-Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Laserimager Typhoon 8200	Amersham, Braunschweig
MegaFuge 1.0R Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Millipore Wasser-Filtrationsanlage	Millipore, Eschhorn
NanoDrop® 1000 UV/VIS Spektrometer	Peqlab, Erlangen
Neubauer-Zählskammer	Brand, Wertheim
Optima™ L-70 Ultrazentrifuge (UZ)	Beckman-Coulter, Palo Alto, CA, USA
pH-Meter	Wiss. Tech. Werkst., Weilheim
Pipetboy, 30-300 µl	Brand, Wertheim
SPR-Spektrometer Biosuplar-2	Analytical µ-Systems, Sinzing
Stereomikroskop (Stemi 2000)	Zeiss, Jena
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Superfusionskammer	F.I.T. Fruth, Parsberg
TE 77XP Semi-Dry Unit	Hoefer, Holliston, MA, USA
Temperaturkontrolleinheit HAT 200	Ibidi, Martinsried
Thermocycler TRISTAR	Biometra, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge E5415 C	Eppendorf, Hamburg
Videokamera AxioCam Mrm	Zeiss, Jena
Waage Sartorius excellence E1200S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad (JULABO SW-20C)	JULABO Labortechnik, Sellbach
X-Cell SureLock™mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

ECL-Film	Amersham, Braunschweig; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Einmal Insulinspritze, 1 ml	Becton Dickinson, Basel, Schweiz
Einmalpipetten	Corning, Corning, NY, USA
Einmalspritzen steril	Becton Dickinson, Basel, Schweiz
Elektroporationsküvetten 2 mm	Peqlab, Erlangen
ELISA-Platten (Immunolon 2HB)	Thermo, Milford, MA, USA
ELISA-Platten (MaxiSorp™)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Fettstift (DakoCytomation Pen)	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Nitrocellulosemembran Optitran BA-S 83	Whatman, Dassel
Objekträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Ohrmarken und Zange	Hauptner, Solingen
PCR-Reaktionsgefäße	Peqlab, Erlangen
Petrischalen, 35x10 mm	Becton Dickinson, Basel, Schweiz
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Poly-D-Lysin culture slides	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Schreddersäulen für DNA	Qiagen, Hilden
Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Millipore, Eschborn
SuperFrost Plus Objekträger	Menzelgläser, Braunschweig
Whatman Filterpapier	Biometra, Göttingen
Zellkulturflaschen	Corning, Corning, NY, USA
Zellculture slides (6- und 24-well)	Falcon, Heidelberg
Zellculture slides (96-well)	Corning, Corning, NY, USA
Zellsieb, 40 µm	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (für ZU, 13 x 51 mm)	Beckman, Palo Alto, CA, USA

## 2.3 Substanzen, Chemikalien und Reagenzien

Tris	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SDS	Fluka, Buchs
TEMED	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Ciprobay	Bayer, Leverkusen
Apo-Transferrin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
BDNF	R&D, Wiesbaden
BSA Fraktion V	Biomol, Hamburg

Cytosin-Arabinofuranosid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Diaminobutan dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dispase II	Roche, Mannheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol (96%)	Merck, Darmstadt
Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
HS-C15-COONHS Ester	Prochimia, Sopot, Polen
Humanes Immunglobulin G	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Humanes Komplementserum	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
inkomplettes Freund-Adjuvans	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ketamin	Zentrales Tierlaboratorium, Regensburg
Kollagen II vom Huhn	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kollagen Typ II (bovin, 2 mg/ml in 0,5 M Essigsäure)	Chondrex, Seattle, USA
komplettes Freund's-Adjuvant	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Levamisole	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
LPS aus Escherichia coli 0111:B4	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Thyroxin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Matrigel (Wachstumsfaktor reduziert)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Mykobakterium tuberculosis H37 Ra	Difco Laboratories, Franklin Lakes, USA
NaCl-Lösung, steril (0.9%)	Braun, Melsungen
Natrium-Selenit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NBT/BCIP Substrat	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Nervenwachsumtsfaktor 7S (NGF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NPN-2/Fc	R&D, Wiesbaden
Progesteron	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protein G-Sepharose	Gerbu, Gaiberg
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
Semaphorin 3F/Fc	R&D, Wiesbaden
Streptavidin Sepharose	Amersham, Uppsala, Schweden
SYPRO® Red Protein Gel Stain	Invitrogen, Karlsruhe
TissueTek	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
TMB	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Transfektionsreagenz jetPEI™	Biomol, Hamburg
Triiodothyronin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Xylazin	Zentrales Tierlaboratorium, Regensburg
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

## 2.4 Kits und Enzyme

Agilent Protein 230 Kit Guide	Agilent Technologies, Waldbronn
AEC Substrat Kit für Peroxidase	Vector Laboratories, Burlingame, USA
CloneJET™ PCR cloning kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Desoxynukleotidmischung	Roche, Mannheim
ECL-Westernblot-Detektionskit	GE Healthcare, Freiburg
Fast-Link™ DNA Ligation Kit	Epicentre, Madison, WI, USA

Micro BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
PCR Aufreinigungs Kits	Hiss, Freiburg; Peqlab, Erlangen
PCR-Master-Mix Y	Peqlab, Erlangen
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, NEB, Frankfurt am Main
Plasmid miniprep Kit	Peqlab, Erlangen
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Reverse Transkription System Kit	Promega, Mannheim
Rnase-Free Dnase Set (50)	Qiagen, Hilden
RNeasy mini-Kit	Qiagen, Hilden

## 2.5 Zelllinien

Schneider S2-Zellen wurden bei 21° C ohne zusätzliche CO<sub>2</sub>-Begasung in Insect Xpress-Medium plus 10% FCS kultiviert. Die Selektion fand unter Anwesenheit von 300 µg/ml Hygromycin statt. Sollten produzierte Fusionsproteine über Affinitätschromatographie gereinigt werden, wurde kein FCS zugesetzt.

## 2.6 Lösungen, Medien und Puffer

BSA-Lösung (10%)	5 g BSA ad 50 ml PBS + 0,3% Triton
DEPC-PBS	5 PBS-Tabletten in 1 l DEPC-Wasser
DEPC-Wasser	2 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat) in 2 l aqua bidest. autoklavieren
F-12 Medium + GlutaMax	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehydlösung (3,7%)	100 ml 37% Formaldehyd ad 1 l DEPC-PBS
HEPES Puffer	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Krebs-Ringer Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PBS	137 mM NaCl 2,68 mM KCl 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,76 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in aqua bidest.
Ripa Puffer	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Saccharose-Lösung (20%)	5 g Saccharose in 25 ml DEPC-PBS
TBS (10x)	1,5 M NaCl 100 mM Trishydroxymethylaminomethan in aqua bidest pH 7,6 mit HCl einstellen

## 2.7 Größenstandards

Die Größe der Nukleinsäurefragmente wurde durch die Verwendung des Größenstandards GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Rot) bestimmt.

Zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen wurde der SeeBlue® Plus2 Größenstandard (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Isolierung von RNA aus Ganglien

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Ganglien wurde mit dem RNeasy® mini Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Methode dieser RNA-Isolation beruht auf einer spezifischen Aufreinigung der RNA über hydrophile Silizium-Gelsäulen unter Verwendung geeigneter Puffersysteme. Die Ganglien wurden durch Schreddersäulen in einem  $\beta$ -Mercaptoethanol- und Guanidinethiocyanat-haltigen Lysepuffer homogenisiert und lysiert. Dieses chaotropen Salz denaturiert sämtliche Proteine inklusive RNAsen und gewährt somit die Isolation von intakter, nicht degraderter RNA. Das Lysat wurde mit Ethanol verdünnt und durch eine Säule mit einer Silicagel-Membran zentrifugiert. Verunreinigungen wurden mit geeigneten Puffern weggeschwemmt, bevor die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert wurde. Die Menge und Reinheit der isolierten RNA wurde mit dem NanoDrop® 1000 UV/VIS Spektrometer bestimmt und anschließend bei -80°C gelagert.

#### 3.1.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Das Umschreiben von der in der isolierten Gesamt-RNA enthaltenen mRNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mit dem Reverse Transcription System Kit, der die Reverse Transkriptase (RT) des *Avian Myeloblastosis Virus* (AMV RT) benutzt. Die RT-PCR wurde sowohl mit Oligo(dT)<sub>15</sub> als auch mit zufällig generierten (Random) Primern durchgeführt. Die Ansätze wurden mit kontaminationsfreien Aerosolfilter-Pipettenspitzen nach folgendem Schema pipettiert:

Ansatz	Programm
RNA	1 µg
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µl
Puffer (10x)	2 µl
dNTP Mix (je 10mM)	2 µl
Oligo(dT) <sub>15</sub> /Random Primer (500ng/µl)	1 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl
Reverse Transkriptase	15 u
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die Proben wurden zum Umschreiben der RNA in cDNA in einem PCR-Cycler 15 min bei 42° C inkubiert und anschließend zur Denaturierung der reversen Transkriptase 5 min auf 99° C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 4°C wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

### 3.1.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Durch den Einsatz bakterieller Polymerasen können DNA-Sequenzen in einer PCR amplifiziert werden. Spezifische DNA-Fragmente können durch die Verwendung zweier entgegengesetzt orientierter Primer vermehrt und somit detektierbar gemacht werden. Die Ansätze wurden mit kontaminationsfreien Aerosolfilter-Pipettenspitzen nach folgendem Schema pipettiert:

Ansatz	Programm
Qiagen Taq PCR Master Mix	10 µl
Primer forward (10 µM)	0,5 µl
Primer reverse (10 µM)	0,5 µl
DNA	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 20 µl
	95°C 2 min
	95°C 30 sec
	60°C 30 sec
	72°C 45 sec
	72°C 7 min
	4°C 5 min

Folgende Primer wurden für die PCR verwendet:

<b>NPN-1 forward</b>	5' TTCCGCAGCGACAAATGTGG 3'	1300 bp
<b>NPN-1 reverse</b>	5' TGTCGGCTTGATTGGATGCTGT 3'	
<b>NPN-2 forward</b>	5' GATGGCTTCTCCGCACGTTACTATT 3'	1002 bp
<b>NPN-2 reverse</b>	5' GCCCAGCACCTCCAGCCTC 3'	
<b>Plexin A1 forward</b>	5' CCGACCTTCTACCGTGTGAGCC 3'	1278 bp
<b>Plexin A1 reverse</b>	5' ACGGTCACGCATGGAGAAGCTAC 3'	
<b>Plexin A2 forward</b>	5' TCTTCGCCAGCTTATCAACAAAC 3'	1034 bp
<b>Plexin A2 reverse</b>	5' GGTCTCAAACAAGTCGTCCACAAAT 3'	
<b>Plexin A3 forward</b>	5' TGCGGCTTCAGCTGCTCTCC 3'	1104 bp
<b>Plexin A3 reverse</b>	5' CGGCATCTCCTCACAAACTGG 3'	
<b>Plexin A4 forward</b>	5' CCTCCTCTCACCGTCTCTCCAA 3'	1335 bp
<b>Plexin A4 reverse</b>	5' GGCAGGTTGTTGATCTCCATTCC 3'	

Die Primer wurden von der Firma MWG (Köln) synthetisiert. Es wurde eine 100 µM Stammlösung der Primer durch Lösen in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> hergestellt und bei -20°C gelagert.

Anschließend wurden die PCR-Fragmente auf einem Agarosegel analysiert. Man macht sich dabei die negative Gesamtladung der DNA-Doppelhelix zunutze, welche durch die unter physiologischen Bedingungen deprotonierten Phosphatgruppen des Rückgrats entsteht. DNA-Fragmente wandern daher im elektrischen Feld, wobei die elektrophoretische Mobilität indirekt proportional zum Logarithmus der Anzahl ihrer Basen ist. Zur Auf trennung der DNA wurden 1,5%ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in TAE-Puffer (1x) aufgekocht und nach dem Abkühlen auf etwa 50° C wurde Ethidiumbromid zugegeben (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Als Laufpuffer diente TAE-Puffer (1x). Nach der Festigung des Gels wurden die mit dem Ladepuffer (Peqlab, Erlangen) versetzten DNA-Proben bei 100V in Gelelektrophoresekammern aufgetrennt und die DNA-Fragmente auf einem UV-Schirm bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und photographiert.

Lösungen und Zubehör für die Agarose-Gelelektrophorese:

DNA-Agarosegel	1,2% Agarose (w/v) in TAE (1x)
E-Gel® 1,2%	Invitrogen Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung	0,04% Ethidiumbromid in VE-Wasser
TAE (50x)	2 M TRIS 250 mM Na-Aacetat/Essigsäure pH 7,8 50 mM EDTA pH 8,0 in VE-Wasser

Ladepuffer (10x)	200 mM TRIS/HCL pH 7,8 100 mM EDTA pH 8,0 1% SDS (w/v) 60% Glycerol (v/v) 0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylencyanol In aqua bidest.
------------------	--

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 SDS-PAGE

Ein Proteingemisch wird mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend des Molekulargewichts seiner Komponenten aufgetrennt. Die Proteine werden zunächst durch die Behandlung mit Probenpuffer denaturiert. Der Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) bewirkt eine Spaltung intramolekularer Disulfidbrücken (Reduktion). Durch die Anwesenheit von SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung, was eine Auftrennung ausschließlich nach der Größe der zu untersuchenden Proteine ermöglicht. Für die Auftrennung der denaturierten Proteine mittels SDS-PAGE wurde das Proteinlysat 5 min in 2x Laemmli-Puffer bei 95° C erhitzt und anschließend bei 35 mA/150 V auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Als Trengel wurde ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel (pH 8,8) verwendet, welches mit einem 5%igen Sammelgel (pH 6,8) überschichtet wurde.

Lösungen und Zubehör für die Agarose-Gelelektrophorese:

12% Laufgel	3,3 ml H <sub>2</sub> O 4,0 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid (30%/0,8% w/v) 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 0,1 ml SDS (10%) 0,1 ml Ammoniumpersulfat (10%) 0,004 ml TEMED
-------------	--

5% Trengel	6,8 ml H <sub>2</sub> O 1,7 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid (30%/0,8% w/v) 1,25 ml 1,0 M Tris (pH 6,8) 0,1 ml SDS (10%) 0,1 ml Ammoniumpersulfat (10%) 0,01 ml TEMED
Laemmli-Probenpuffer (6x)	375 mM Tris/HCl pH 6,8 12 mM EDTA 7,5% SDS (w/v) 60% Glycerol (v/v) 0,2% Bromphenolblau (w/v) In aqua bidest.
Tris-Glycin Laufpuffer (10x)	250 mM Tris 2,5 M Glycin 1% SDS (w/v) In aqua bidest.

### 3.2.2 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen (Blotten)

Für den Transfer der in der SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde das *Semi-dry*-Verfahren benutzt. Hierfür wurden je ein Filterpapier (Whatman) in Anodenpuffer A, zwei in Anodenpuffer B und drei in Kathodenpuffer C getränkt. Das Gel und die Nitrocellulosemembran wurden ebenfalls in Kathodenpuffer C equilibriert und in die Blotapparatur gelegt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte mit dem TE 77XP Semi-dry Blotter für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 1,5 mA pro cm<sup>2</sup> Gel.

Folgende Puffer wurden für das Blotten verwendet:

Anodenpuffer A	0,3 M Tris pH 10,4 20% Ethanol in VE-Wasser
Anodenpuffer B	25 mM Tris pH 10,4 20% Ethanol in VE-Wasser

Kathodenpuffer C	5,4 mM $\epsilon$ -Amino-n-Capronsäure pH 7,6 20% Methanol in VE-Wasser
------------------	---

### 3.2.3 Immunodetektion der Proteine

Für die Detektion der auf die Nitrocellulosemembran transferierten Proteine wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 h bei RT oder bei 4° C über Nacht in PBS mit 5% Milchpulver inkubiert. Danach wurde die Membran kurz in Waschpuffer (PBST + 0,05% Tween 20) geschwenkt und anschließend für mindestens eine Stunde bei RT unter leichtem Schütteln mit dem in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper inkubiert. Die Membran wurde 3x 5 min mit Waschlösung gewaschen und anschließend für eine weitere Stunde mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper (Horseradish Peroxidase (HRP)-gekoppelt; in PBS mit 5% Milchpulver) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriften von je 15 min wurde der Blot entweder mit dem AEC Substrat Kit für Peroxidase, meistens aber mit dem Detektionssystem ECL Plus gefärbt werden. Das ECL-Detektionssystem besteht aus dem Acridan Substrat Lumigen PS-3, das durch die HRP in einen Acridiniumester umgewandelt wird. Der Ester reagiert unter alkalischen Bedingungen mit Peroxid und emittiert Licht. Die entstehende Lumineszenz wurde auf einem Röntgenfilm mit unterschiedlicher Expositionsdauer je nach Signalintensität aufgenommen. Der Film wurde anschließend in einem Entwicklerautomaten entwickelt.

Lösungen für die Proteindetektion:

Blocklösung	5% Magermilchpulver (w/v) in PBST
Waschlösung (PBST)	0,05% Tween 20 (v/v) in PBS

### 3.3 Herstellung des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukts

Die Konstruktion und Herstellung des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukts (NPN-2fc) erfolgte im Labor von Prof. Falk (Innere Medizin I, Uniklinik Regensburg). Die biochemische Struktur des NPN-2 (NM\_010939) wurde mit Hilfe von SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/smart/>) analysiert. Anhand von Primern, die die entsprechenden Restriktionsschnittstellen enthielten, wurden die cDNAs, die für den extrazellulären Teil (ausschließlich der Signalsequenz) kodierten, mit Hilfe der PCR vermehrt. Zusätzlich enthielten die 5' Primer eine N-terminale Markierungssequenz (FLAG;(DYKDDDDK)) um die Detektion des Expressionsproduktes zu ermöglichen. Das verdaute PCR Produkt wurde im Leseraster mit dem humanen IgG1-Fc Fragment des pSignal-Vektor (R&D) kloniert. Die Neuropilin-Fc Fragmente wurden ausgeschnitten und mit der BiP-Signalsequenz in das Leseraster des pMT/BiP-Vektors (Invitrogen) ligiert. Dieser Expressionsvektor wurde zusammen mit dem pHygro-Vektor (trägt Resistenzgen gegen Hygromycin B) cotransfiziert und für die stabile Transfektion von Schneider S2 Zellen (Insektenzellen) benutzt, um die Sezernierung des Proteins in den Zellüberstand nach der Stimulation mit Kupfersulfat zu überprüfen. Das Protein wurde durch Präzipitation mit Protein G-Sepharose gereinigt und im Western-Blot analysiert. Nach 48 Stunden wurde das Selektionsantibiotikum Hygromycin B hinzugefügt. Nach einer vierwöchigen Selektion wurden überlebende Zellen vermehrt und dann in ein serumfreies S2 Expressionsmedium überführt. Alle Manipulationen wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt um eine Kontamination mit LPS zu vermeiden.

Die Zellen wurden eine Woche lang mit Kupfersulfat stimuliert. Anschließend wurden die Überstände der Zellen gesammelt und über eine Protein G-Sepharose konzentriert und gereinigt. Die Reinheit und Menge des rekombinanten Proteins wurden mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 bestimmt.

Für die Reinigung des Fusionsproteins mit einem hIgG-Fc-Teil wurde Protein G-Sepharose verwendet (Fc-Teil des humanen IgG bindet an Protein G). Die Reinigung erfolgte durch Immunpräzipitation. Dafür wurde der Zellüberstand auf 50 ml Zentrifugenrührchen aufgeteilt und mit 200 µl einer 50%igen Protein G-Suspension für 1h im Rotator inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend bei 850 x g pelletiert, in 5 ml PBS resuspendiert und in eine Säule geladen. In der Säule erfolgte ein weiterer Waschschritt mit 20 ml PBS. Das Fusionsprotein wurde mit 1 ml 0,1 M

Glycin/HCl-Puffer (pH 2,8) in 2 Fraktionen eluiert. Das Eluat wurde anschließend für 4 h in einer Dialysekassette (Ausschlussgröße 10 kD) gegen PBS dialysiert, die Proteinmenge mit dem Agilent Protein 230 Kit gemessen und bei -80°C gelagert.

### 3.4 Immunhistochemie

Unter Immunhistochemie versteht man den Nachweis antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten durch Antikörper (Ak), die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, Goldpartikeln oder Isotopen gekoppelt sind. Bei der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung bindet zunächst der primäre, unkonjugierte Antikörper (Primär-Ak) an das Antigen im Gewebeschnitt. Anschließend werden die Schnitte mit einem zweiten, fluoreszierenden Antikörper (Sekundär-Ak), der gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist, inkubiert. Durch eine Anregung des Fluorophors mit Licht entsprechender Wellenlänge wird der Antigen-Antikörper-Komplex detektierbar. Die Mikroskopische Auswertung erfolgte mit einem Leitz DMRXE Mikroskop.

#### 3.4.1 Färbung von sympathischen Mausganglien

Für die immunhistochemischen Färbungen der Nervenfasern von sympathischen Mausganglien wurden die Ganglien wie in Kapitel 3.5 beschrieben ausgebaut und in *culture slides*, welche vorher mit Matrigel gefüllt wurden, eingesetzt. Das entsprechende Wachstumsmedium sorgte für das Auswachsen der Nervenfasern.

##### 3.4.1.1 Tyrosinhydroxylase-Fluoreszenzfärbung

Die Tyrosinhydroxylase (TH) katalysiert die Umwandlung der Aminosäure L-Tyrosin in die Aminosäure L-Dopa, aus der in weiteren enzymatischen Schritten die Katecholamine hervorgehen. Dieser erste Tyrosinhydroxylase-vermittelte Schritt ist der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt der Biosynthese der Katecholamine.

Die in Matrigel ausgewachsenen Nervenfasern wurden zunächst für 3x 5 min mit PBS + 0,3% Triton gewaschen und anschließend in einer 3,7%-igen Formalinlösung in DEPC-H<sub>2</sub>O für 45 min fixiert. Danach wurden die Gewebeschnitte nochmals 3x 5 min in PBS + 0,3% Triton gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Antikörper-

Bindungsstellen wurden die Ganglien in einer Blocklösung aus BSA, FCS und Hühnerserum in PBS + 0,3% Triton für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 5 Minuten folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen die Tyrosinhydroxylase über Nacht bei 4° C. Dafür wurde der Antikörper 1:100 in einer 1%igen BSA/PBS + 0,3% Triton Lösung verdünnt. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper folgten wiederum ein Waschschritt und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1,5 h bei 25° C im Dunkeln. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls wie der primäre Antikörper in 1% BSA in PBS + 0,3% Triton inkubiert. Anschließend wurden der Deckel und die Wände der *culture slides* entfernt und die Ganglien mit Fluorescent Mounting Medium und einem Deckglas eingedeckt. Für Kontrollfärbungen wurde der primäre Antikörper weggelassen.

Lösungen und Puffer für die Tyrosinhydroxylase-Fluoreszenzfärbung:

Blocklösung	1%BSA, 10% FCS, 10% Hühnerserum in PBS + 0,3% Triton		
Ak-Verdünnungslösung	1% BSA in PBS + 0,3% Triton		
TBS-T buffer	6.1 g/l Tris 8.8 g/l NaCl 37 ml ad 1 l 0.05%	1 N HCl $H_2O_{dest.}$ TWEEN 20	pH 7.6

Antikörper für die Tyrosinhydroxylase-Fluoreszenzfärbung:

Primärer Ak	Spender	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Anti-Tyrosinhydroxylase	Kaninchen	nichts	1:100	Chemicon
Sekundärer Ak				
Anti-Kaninchen IgG	Ziege	AlexaFluor 546	1:150	Invitrogen

### 3.4.1.2 NPN-2-Fluoreszenzfärbung

Die NPN-2-Färbung erfolgte nach demselben Protokoll wie die Tyrosinhydroxylase-Immunhistochemie in 3.4.1.1. Der einzige Unterschied war die Verwendung eines anderen primären Antikörpers.

Antikörper für die NPN-2-Fluoreszenzfärbung:

Primärer Ak	Spender	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Anti-NPN-2	Kaninchen	nichts	1:100	eigene Herstellung
Sekundärer Ak				
Anti-Kaninchen IgG	Ziege	AlexaFluor 546	1:150	Invitrogen

### 3.4.2 Färbung von Synovialgewebe (Patientenmaterial)

Für die Immunfluoreszenz wurden alle Gewebe in einer 3,7%igen Formalinlösung fixiert, über Nacht in einer 20%igen Saccharoselösung inkubiert und in TissueTek eingebettet.

#### 3.4.2.1 NPN-2-Fluoreszenzfärbung

Zur Quantifizierung von NPN-2-positiven Nervenfasern im Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten wurden mit einem Kryostaten 8 µm dicke Kryoschnitte des Synovialgewebes angefertigt, auf Objektträger überführt und für 30 min luftgetrocknet. Um das Verlaufen der aufgetragenen Lösungen zu vermeiden, wurden die Schnitte mit einem Fettstift umkreist und anschließend 10 min in PBS gewaschen. Alle folgenden Inkubationen wurden, sofern nicht anders angegeben in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Daraufhin wurde auf jeden Schnitt zur Absättigung unspezifischer Bindungen eine Blocklösung aus BSA, FCS und Hühnerserum in PBS + 0,3% Triton aufgetragen und 45 min inkubiert. Nach dem Abschütteln der Blocklösung wurden die Schnitte 10 min in PBS gewaschen, bevor auf jeden Schnitt die Primärantikörper-Lösung pipettiert wurde. Die Schnitte wurden mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4° C inkubiert. Bei der Negativkontrolle wurde anstelle der Primärantikörper-Lösung nur der Antikörper-

Puffer verwendet. Am nächsten Tag wurden überschüssige Antikörper durch zweimaliges Waschen mit PBS + 0,3% Triton für je 5 min und anschließendes Waschen für 5 min in PBS gewaschen, bevor auf jeden Schnitt der Sekundärantikörper pipettiert wurde. Die Schnitte mit dem Sekundärantikörper wurden bei Dunkelheit 90 min inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte erneut 2x 5 min in PBS + 0,3% Triton und 5 min in PBS gewaschen und mit *Fluorescent Mounting Medium* eingedeckt. Bis zur Auswertung innerhalb der darauf folgenden Woche wurden die Objektträger dunkel und im Kühlschrank bei 4° C gelagert. Am Fluoreszenzmikroskop wurden bei 400-facher Vergrößerung die NPN-2-positiven Nervenfasern gezählt. Dabei wurden 17 Gesichtsfelder pro Patient ausgezählt und der Mittelwert der vorhandenen Nervenfasern je mm<sup>2</sup> berechnet.

Lösungen für NPN-2-Fluoreszenzfärbung:

Blocklösung	1% BSA, 10% FCS, 10% Hühnerserum in PBS + 0,3% Triton
Ak-Verdünnungslösung	1% BSA in PBS + 0,3% Triton

Antikörper für NPN-2-Fluoreszenzfärbung:

Primärer Ak	Spender	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Anti-NPN-2	Kaninchen	nichts	1:500	eigene Herstellung
Sekundärer Ak				
Anti-Kaninchen IgG	Ziege	AlexaFluor 546	1:500	Invitrogen

### 3.4.2.2 Semaphorin 3C-Färbung

Zur Färbung von Semaphorin 3C-positiven Zellen im Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten wurde das in TissueTek eingefrorene Synovialgewebe 5 µm dick geschnitten und die Schnitte auf Objektträger gebracht und eine halbe Stunde an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte 10 min in TBS rehydriert, kurz abgeklopft und zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen 2 h mit Blocklösung inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte 1 h mit dem primären

Antikörper inkubiert. Sowohl Primär- als auch Sekundär-Ak wurden mit einer TBS-Lösung verdünnt, welche 10% BSA enthielt (Ak-Verdünnungslösung). Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit dem Primär-Ak inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Serum, das vor Immunisierung gewonnen wurde, eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS für je 5 min folgte eine 1,5 h Inkubation mit einem Alkalische Phosphatase-konjugierten sekundären Antikörper.

Lösungen für die Semaphorin 3C-Färbung:

Blocklösung	1% BSA, 10% FCS, 10% Hühnerserum in PBS + 0,3% Triton
Ak-Verdünnungslösung	10% BSA in TBS

Antikörper für die Semaphorin 3C-Färbung:

Primärer Ak	Spender	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Semaphorin 3C-Antiserum	Kaninchen	nichts	1:1000	eigene Herstellung
Sekundärer Ak				
Anti-Kaninchen IgG	Ziege	Alkalische Phosphatase	1:100	DakoCytomation

### 3.4.2.3 Semaphorin 3F-Färbung

Zur Färbung von Semaphorin 3F-positiven Zellen im Synovialgewebe von Patienten wurden AP-Färbungen des Synovialgewebes durchgeführt (AP = Alkalische Phosphatase). Dazu wurden das in TissueTek eingefrorene Synovialgewebe ebenfalls wie bei der Semaphorin 3C-Färbung 5 µm dick geschnitten und die Schnitte auf Objektträger gebracht und eine halbe Stunde an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Fettstift umkreist, 10 min in TBS rehydriert. Um die Aktivität gewebseigener alkalischer Phosphatasen der Zellen im Gewebeschnitt zu senken wurden die Objektträger für 20 min in einem 20%igen Essigsäure/H<sub>2</sub>O-Gemisch bei 4°C inkubiert und anschließend 2 x 5 min in TBS gewaschen. Nach der 45-minütigen Inkubation mit der Blocklösung wurden die

Schnitte 10 min in TBS gewaschen, bevor auf jeden Schnitt der Primärantikörper pipettiert wurde. Die Schnitte wurden mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei der Negativkontrolle wurde anstelle der Primärantikörper-Lösung nur der Antikörperpuffer verwendet. Dann wurden die Schnitte 2x 5 min in TBST und 5 min in TBS gewaschen, bevor auf jeden Schnitt der Sekundärantikörper (Alkalische Phosphatase-konjugiert) pipettiert wurde. Die Schnitte wurden mit dem Sekundärantikörper wiederum 1 h inkubiert und anschließend wieder gewaschen. Danach wurde ein Substrat-System bestehend aus 4-Bromo-4-Chloro-3-Indoxylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) mit einem Tropfen Levamisol, welches die gewebseigenen alkalischen Phosphatasen inhibiert, gemischt und auf die Schnitte gegeben. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte alkalische Phosphathase spaltet Phosphatverbindungen dieses Substrates ab und die so freigesetzten Verbindungen reagieren dann zu einem violett-blauen Endprodukt. Die Farbentwicklung wurde unter dem Mikroskop beobachtet und nach Erreichen der gewünschten Farbintensität positiv gefärbter Zellen mit Wasser gestoppt. Dazu wurden die Schnitte abgeklopft und 3x 5 min in Wasser gewaschen und anschließend mit *Aqueous Mounting Medium* eingedeckt. Die Auswertung der Färbung am Mikroskop erfolgte bei 400-facher Vergrößerung. Pro Patient wurden 17 Gesichtsfelder nach positiv-gefärbten Zellen ausgezählt. Die Ergebnisse sind in positive Zellen je mm<sup>2</sup> angegeben.

Lösungen für die Semaphorin 3F-Färbung:

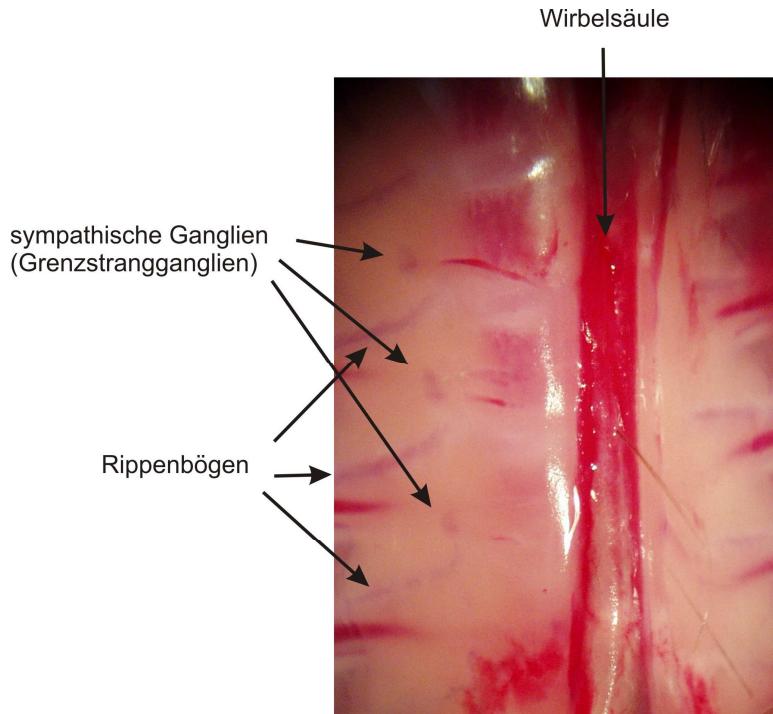
Blocklösung	10% BSA, 10% FCS, 10% Hühnerserum in TBS + 0,05% Tween 20
Ak-Verdünnungslösung	10% BSA in TBS + 0,05% Tween 20

Antikörper für die Semaphorin 3F-Färbung:

Primärer Ak	Spender	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Anti-Semaphorin 3F	Kaninchen	nichts	1:200	Millipore
Sekundärer Ak				
Anti-Kaninchen IgG	Ziege	Alkalische Phosphatase	1:100	DakoCytomation

### 3.5 Neuriten-Auswachs-Assay

Bereits 1977 entwickelte Robert B. Campenot eine Methode für das Auswachsen von Nervenfasern aus Rattenneuronen [212]. Diese Methode ließ sich auf Mäuseneuronen nicht übertragen, weshalb eine neue Methode für das Auswachsen von Nervenfasern aus sympathischen Mäuseganglien entwickelt werden musste. Die Vorteile von Mäusen gegenüber Ratten sind ihre geringere Kosten und ihre einfachere Handhabung. Anstatt einzelner Neuronen wurden Ganglien verwendet, da diese ein feines Netzwerk von vielen Nervenfasern ausbilden und somit besser sichtbar sind. Für die Gewinnung von Ganglien wurden 2-3 Tage junge C57BL/6-Mäuse durch Dekapitation getötet. Ein entscheidendes Kriterium war das Alter der Mäuse. Sie durften nicht älter als 4 Tage sein, da die Nervenfasern sonst nicht mehr auswachsen. Bei Mäusen, die jünger als 2 Tage waren, konnte man die Ganglien nicht richtig erkennen, und somit auch nicht ausbauen. Mit der Hilfe von dünnen Pinzetten wurden die Ganglien aus den Mäusen unter Zuhilfenahme des Binokulars Zeiss Stemi 2000 stereo microscope ausgebaut.



**Abb. 3.1: Geöffneter Brustkorb einer Maus nach Entfernung der inneren Organe**

Zu erkennen sind die paravertebralen sympathischen Ganglien, die sich zwischen den Rippenbögen befinden. Aufgrund ihrer Anordnung werden sie auch als Grenzstrangganglien bezeichnet.

Es handelte sich hierbei um die sympathischen paravertebralen Grenzstrangganglien der Maus, die beiderseits an der Wirbelsäule angrenzen. Die ausgebauten Ganglien wurden in 40µm Zellsieben in F-12 + GlutaMax Medium gesammelt.

Wachstumsmedium für den Neuriten-Auswachs-Assay:

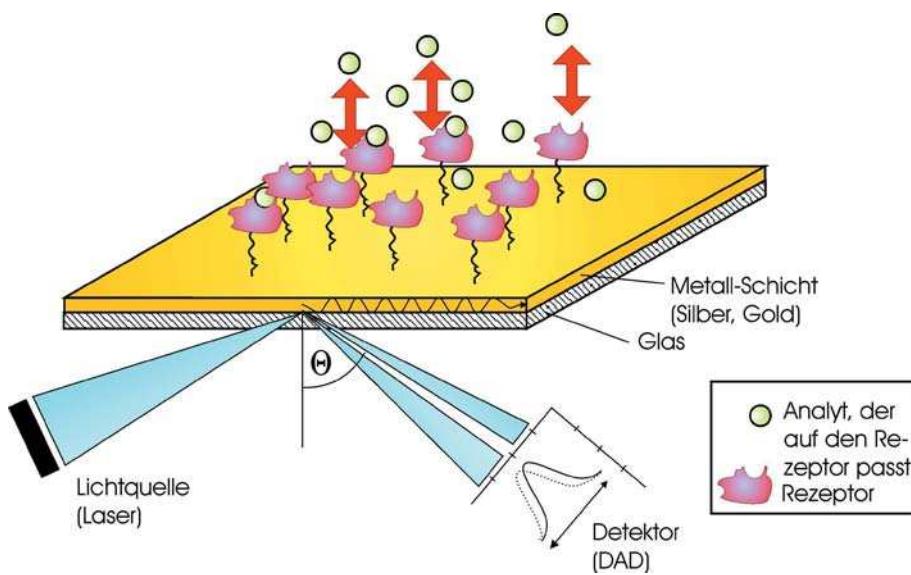
Substanz	Menge/ml Ham's F-12 Wachstumsmedium
BSA	3,5 mg
Cytosin-Arabinofuranosid	2,4 µg
Insulin	0,125 I.E.
Nervenwachstumsfaktor	100 ng
Progesteron	60 ng
Putrescin	8,8 µg
Transferrin	34 µg
Triiodothyronin	340 ng
L-Thyroxin	400 ng
Na-Selenit	38 ng
Ciprofloxacin	16 µg
Penicillin/Streptomycin	100 U

Ungefähr 8-9 sympathische Grenzstrangganglien können aus einer Maus ausgebaut werden. Anschließend wurden die Ganglien enzymatisch mit dem Enzym Dispase (2,4 U/ml) für 15 Minuten bei 37°C anverdaut um das Auswachsen der Nervenfasern zu erleichtern. Danach folgten 3 Waschschritte mit Medium für jeweils 5 Minuten. Die anverdauten Ganglien wurden in den ersten Versuchen in ein Matrigel eingesetzt, in der Folge jedoch dann auf mit Poly-D-Lysin beschichteten *culture slides* gesetzt. Durch die Zugabe von 100 ng/ml Nervenwachstumsfaktor (NGF) zum Medium wurden die Nervenfasern zum Wachstum angeregt. Das Medium enthielt neben versch. Zusätzen noch Penicillin/Streptomycin und Ciprofloxacin. Die Ganglien wurden im Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C für zwei Tage inkubiert. Ungefähr bei 25% der ausgebauten Ganglien sind Nervenfasern ausgewachsen. Nach diesen zwei Tagen Inkubation wurde das Wachstumsmedium durch eine Krebs-Ringer-Lösung ersetzt, die mit 20 mmol HEPES gepuffert wurde. Die Krebs-Ringer-Lösung wurde zuvor sterilfiltriert und der pH auf 7,4 eingestellt. Zu dieser Zeit erreichten die ausgewachsenen Nervenfasern eine Länge von durchschnittlich 500 µm bei einem

durchschnittlichen Durchmesser der Ganglien von 300 µm. Daraufhin wurden zu den Ganglien versch. Konzentrationen des Repulsionsfaktors Semaphorin 3F gegeben. Um das Verhalten der Nervenfasern zu analysieren, wurde über fünf Stunden alle zwei Minuten über *life cell imaging* mit dem Mikroskop und einer daran befestigten Videokamera ein Bild gemacht. Es wurde ein 10x Objektiv verwendet. Während der gesamten Zeit wurden die Ganglien in einem Inkubator für *life cell imaging* konstant bei 37°C gehalten. Dafür wurde die Temperatur-Kontrolleinheit HAT 200 verwendet. Für die Quantifizierung der Repulsion wurden zu Beginn des Experiments mit Hilfe der Zeiss Software (AxioVision Rel. 4.7) die Enden der ausgewachsenen Nervenfasern mit einem gelben Kreuz markiert. Zum Ende des Experiments (nach 5 Stunden) wurde die Zahl der zurückgezogenen Nervenfasern mit einem roten Kreuz markiert. Die zurückgezogenen bzw. ausgewachsenen Nervenfasern wurden ins Verhältnis zur Gesamtzahl der anfangs ausgewachsenen Nervenfasern gesetzt.

### **3.6 Oberflächen-Plasmon-Resonanz**

Die Technik der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) ist eine weit verbreitete Methode um molekulare Interaktionen auf dünnen Metallfilmen zu studieren [213]. Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (kollektive Schwingung der Leitungsbandelektronen) tritt auf, wenn Licht unter bestimmten Gegebenheiten an einem dünnen, leitfähigen Film an der Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex reflektiert wird. Der leitfähige Film besteht aus Gold und wird mit einer Dicke von ca. 50 nm auf eine Adhäsionsschicht aus Chrom aufgedampft. Bei einem bestimmten Einfallswinkel von monochromatischem p-polarisierten Licht kommt es zu einem starken Verlust an Reflexion (trotz erfüllter geometrischer Bedingungen für eine Totalreflexion). Die Größe dieses Winkels ist vom Brechungswinkel nahe der Oberfläche abhängig. Das Licht wird dabei nicht von der Probe absorbiert, sondern die Energie des Lichts wird durch die Oberflächen-Plasmon-Resonanz auf den Goldfilm und die benachbarte Schicht übertragen [214; 215] (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Schematischer Aufbau eines Sensors auf der Basis der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR).**

Ein Rezeptor wird auf der Oberfläche einer Goldschicht immobilisiert. Bindet ein Ligand an den Rezeptor, verändert sich der Brechungsindex und geht mit einer Verschiebung des Winkels der Oberflächen-Plasmon-Resonanz einher. Nach [216]

Die mit Gold bedeckten Glasträger wurden von der Firma Mivitec (Regensburg) bezogen. Vor der Erzeugung der Monoschicht wurde die Goldoberfläche in einer heißen Lösung einer 1:3 Mischung von 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und konzentrierter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Piranha Solution) für 10 Sekunden gereinigt, anschließend mit Wasser gespült und getrocknet. Auf dem trockenen und sauberen Chip wurde eine Monoschicht (SAM, *self assembly monolayer*) aus HS-C15-COO-NHS Ester erzeugt. Die selbstorganisierende Monoschicht aus diesem Ester erhielt man nach einer Adsorption in einer 1 mM ethanolischen Lösung nach einer Zeit von 18 Stunden. Das SPR-Signal wurde mit zwei versch. Natriumchlorid-Lösungen (200 mmol/L und 400 mmol/L) kalibriert, indem mit einem Abbe-Refractometer der Brechungsindex dieser Lösungen bei 22,5° C bestimmt wurde. Die Immobilisierung des NPN-2 Fc-Konstrukts an den Ester erfolgte durch EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid), welches die Carboxy- und Aminogruppen aktiviert. Noch ungebundene Ester wurden durch menschliches Kontroll IgG (Fc) abgeblockt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Semaphorins 3F in versch. Konzentrationen. Bei einer Bindung des Semaphorins an die Rezeptormoleküle (NPN-2fc) auf der Sensoroberfläche, steigt deren Konzentration und damit der Brechungswinkel neben der Oberfläche an. Ein Verschieben des Winkels der Oberflächen-Plasmon-

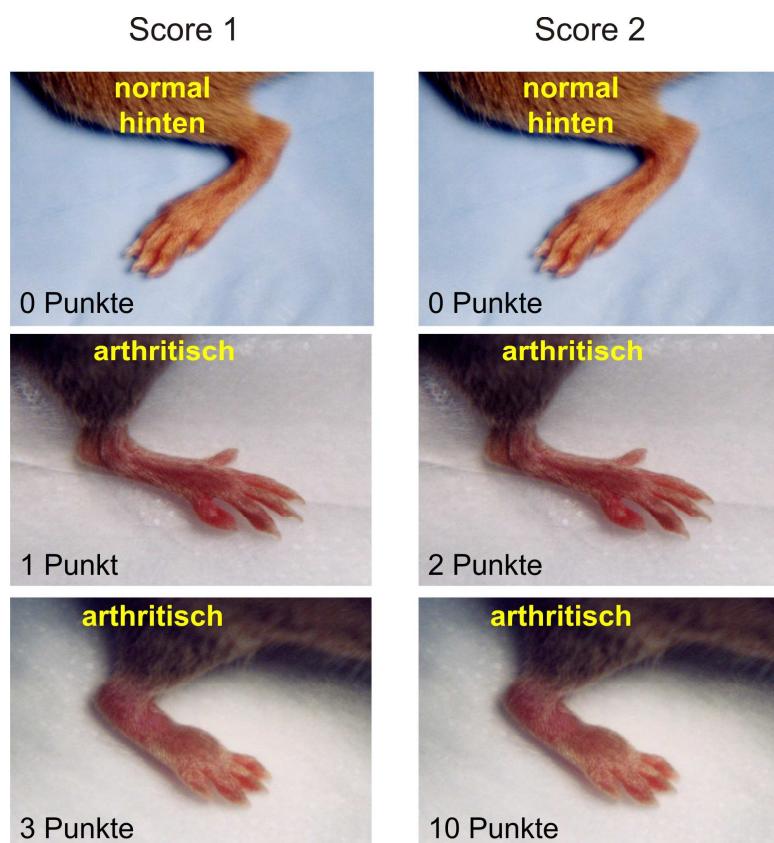
Resonanz ist die Folge. Die SPR-Messung wurde in PBS bei einem pH von 7.3 und Zimmertemperatur mit einem BIOSUPLAR-2 SPR-Spektrometer durchgeführt.

### **3.7 Arthritisinduktion bei DBA/1-Mäusen**

Männliche DBA/1 wurden mit 6-8 Wochen von der Firma Janvier (Le Genest-St-Isle, Frankreich) gekauft. Die Mäuse wurden bei konstanten Temperaturverhältnissen von 21° C in einem 12-stündigen Tages- und Nachrhythmus bei freiem Zugang zu Nahrung und Wasser in den zentralen Tierlaboratorien der Universität Regensburg gehalten. Die Versuchstiere wurden zur Eingewöhnung mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn in den Versuchsraum gebracht und zu je 5 Tieren pro Käfig gehalten. Alle Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Genehmigung durch die Regierung der Oberpfalz AZ 54-2531.1-24/06).

Für die Induktion einer Arthritis wurden die Mäuse ca. 2 cm unterhalb der Schwanzwurzel intradermal mit einer Suspension aus bovinem Kollagen Typ II (C II) und komplettem Freund Adjuvans (CFA) immunisiert. Dazu wurde bovines Kollagen Typ II in einem gleichen Volumen von komplettem Freund Adjuvans mithilfe eines Homogenisators unter Kühlung mit Eis emulgiert. Von der Emulsion wurden dann je 100 µl mittels einer 1 ml Spritze und einer 24G Kanüle pro Maus injiziert, so dass jede Maus 100 µg Kollagen Typ II erhielt. Nach 21 Tagen erhielten die Mäuse eine Boosterinjektion, diesmal jedoch mit 100 µg Kollagen Typ II in inkomplettem Freund Adjuvans. Für die Beurteilung des Arthritisschweregrad wurden zwei versch. Scoresysteme benutzt. Beim Arthritis-Score Nr.1 wurden die Pfoten hinsichtlich einer Schwellung und Beeinträchtigung der Funktionstüchtigkeit untersucht. Dabei wurde jede Pfote separat beurteilt. Jeweils 1 Punkt wurde für die Schwellung der drei folgenden Gelenkregionen vergeben: Finger-Zehen-, Mittelhand-Mittelfuß- und Sprunggelenk-Region. Ein zusätzlicher Punkt wurde vergeben, wenn eine sehr starke Schwellung und eine offensichtliche Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit einer Extremität vorlagen. So konnte insgesamt ein maximaler Arthritis-Score von 4 Punkten pro Pfote und 16 Punkten pro Tier vergeben werden (Abb. 3.3). Beim Arthritis-Score Nr. 2 wurde ebenfalls jede Pfote separat beurteilt und je nach dem Schweregrad der Schwellung einzelner Regionen versch. Punkte vergeben.

Wiederum wurden die Regionen in Finger/Zehen-, Mittelhand/Mittelfuß- und Sprunggelenk-Regionen eingeteilt. Allerdings wurde die Finger-/Zehenregion nicht als Ganzes, sondern jede einzelne Zehe für sich bewertet. Zwei Punkte wurden für eine starke Schwellung, ein Punkt für eine leichte Schwellung und kein Punkt für keine Schwellung einer Region vergeben. Auf diese Weise wurde ein maximaler Arthritisscore von 12 Punkten pro Pfote (2 Punkte x 4 Zehen, 2 Punkte für die Mittelhand/Mittelfuß- und 2 Punkte für die Handgelenk/Knöchel-Region) und 48 Punkten pro Tier erreicht.



**Abb. 3.3: Das Bewertungssystem der beiden Scoresysteme**

Mit der Verwendung des Scores Nr. 2 wurde ein genaueres Scoresystem eingesetzt um geringfügige Unterschiede im Arthritisverlauf besser erkennen zu können.

### 3.8 Superfusion von synovialem Gewebe

Für die Detektion des löslichen NPN-2 wurde die Superfusionstechnik benutzt. Dafür wurden 6 Stücke einer Synovialgewebeprobe in Silikon-Superfusionskammern mit einem Volumen von 80 µl überführt und mit serumfreien Kulturmedium (RPMI 1640, 25 mM HEPES, 1% Penicillin/Streptomycin, 30 µM Mercaptoethanol, 0.57 mM Ascorbinsäure, 1.3 mM Kalcium) superfundiert. Die Superfusion wurde für 2 h bei 37° C und einer Flussrate von 66 µl/min durchgeführt (eine Probe pro Kammer, 6 Kammern parallel). Nach 120 min wurde das Superfusat von allen 6 Proben gesammelt und gepoolt und bei -20°C gelagert.

### 3.9 ELISA

Für die Quantifizierung des im Superfusat enthaltenen löslichen NPN-2 wurde ein ELISA verwendet. Hierfür wurden MaxiSorp™ 96-well ELISA-Platten mit einem Fang-Antikörper (3 µg/ml in ELISA Beschichtungspuffer) über Nacht bei 4° C beschichtet. Nach dem Waschen mit PBS + 0,05% Tween 20 (Waschpuffer) wurde die Platte mit 20% FCS in PBS 1 h bei RT geblockt. Nach einem weiteren Waschschnitt wurden die Proben (Plasma und Synovialflüssigkeit, 1:10 in Blockierlösung verdünnt; das Superfusat wurde nicht verdünnt) für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Platte mit 1 µg/ml Detektionsantikörper für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte fünfmal gewaschen und eine Mischung aus einem biotinyliertem Antikörper, horseradish-peroxidase, und TMB pro Vertiefung zugegeben. Nach 30 min wurde die Reaktion mit 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die entstandenen Farbkomplexe im Absorptionsspektrometer bei den Wellenlängen 450 nm minus 540 nm vermessen. Sämtliche Auswertungen wurden mit der Software *SOFTmax for Windows 2.35* durchgeführt. Als Standard wurde das kommerziell erhältliche NPN-2 Fc-Konstrukt eingesetzt.

Lösungen und Puffer für den NPN-2-ELISA:

ELISA Beschichtungspuffer	0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,6 in aqua bidest.
ELISA Waschpuffer	0,05% Tween 20 in PBS, pH 7,4
ELISA Blockierlösung	20% FCS in PBS
ELISA Stopplösung	1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

Antikörper für den NPN-2-ELISA:

Primärer Ak	Spender	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Anti-Mensch NPN-2	Ziege	nichts	3 µg/ml	R&D
Anti-Mensch NPN-2 (monoklonal)	Maus	nichts	1 µg/ml	R&D
Anti-Maus IgG	Ziege	Biotin	1 µg/ml	R&D

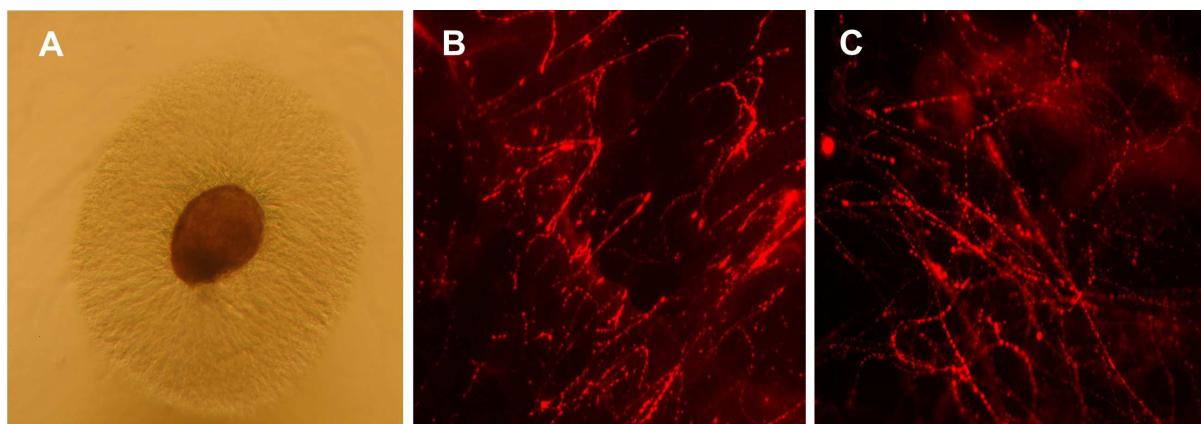
### 3.10 Statistik

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Box-Plots unter Darstellung des Medians, der Ausreißer und der 10.-, 25.-, 75.- und 90.-Perzentilen und als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) in den Tierexperimenten. Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Korrelation zwischen Parametern wurde nach der Spearman Rangkorrelations-Analyse berechnet. Bei einem Vergleich von mehreren Gruppen erfolgte der Kruskal-Wallis-Test. Um Unterschiede innerhalb eines Beobachtungszeitraumes zu vergleichen, wurde die statistische Methode des *General Linear Model* angewandt. Für die statistische Analyse wurden die Programme SPSS (SPSS / PC, V.11.5, SPSS Inc., Chicago, USA) und SigmaStat (V.3.5, Systat Software, Inc., Erkrath, Deutschland) verwendet. Bei einem p-Wert von <0,05 wurden die Unterschiede als statistisch signifikant betrachtet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Nachweis der Tyrosinhydroxylase und des NPN-2 auf sympathischen Ganglien im Matrikel

Zu Beginn der Arbeit wurden die in Matrikel ausgewachsenen Nervenfasern gegen die Tyrosinhydroxylase (TH) und Neuropilin-2 (NPN-2) gefärbt. Diese Färbungen sollten sicherstellen, dass es sich bei den ausgebauten Ganglien wirklich um die sympathischen Ganglien handelt. Zum anderen dienten sie der Überprüfung des NPN-2-Antikörpers. Vorarbeiten haben gezeigt, dass die käuflichen Anti-NPN-2-Antikörper der Firmen Zymed und R&D keine zufriedenstellenden Ergebnisse im Rahmen der Immunhistochemie lieferten. Deshalb wurden für die NPN-2 Färbung Antikörper eingesetzt, die bereits im Labor von Prof. Straub hergestellt wurden.



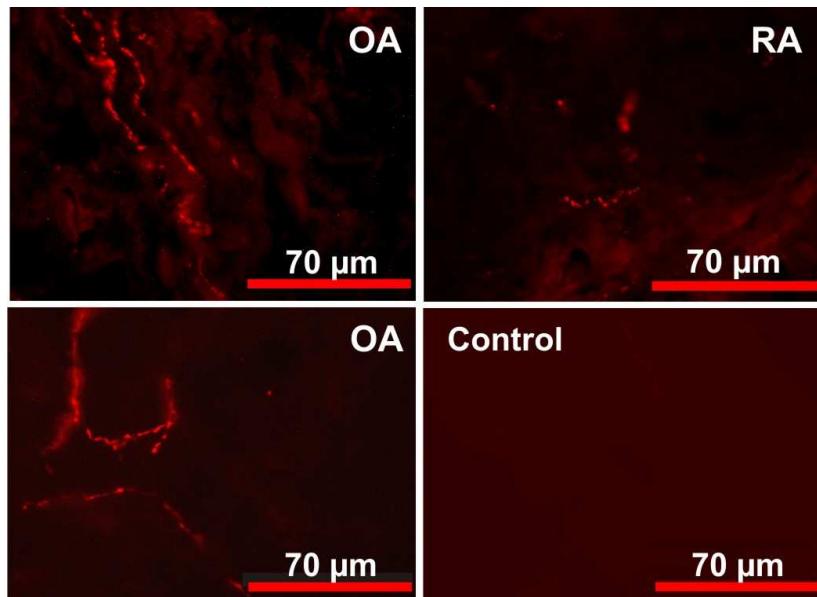
**Abb. 4.1: Immunhistochemie von sympathischen Ganglien im Matrikel**

**A:** Sympathisches Ganglion mit ausgewachsenen Nervenfasern im Durchlicht (40-fache Vergrößerung). **B:** Ausschnitt von Nervenfasern eines ausgewachsenen Ganglions, die gegen die Tyrosinhydroxylase gefärbt wurden (400-fache Vergrößerung). **C:** Ausschnitt von Nervenfasern eines ausgewachsenen Ganglions, die gegen NPN-2 gefärbt wurden (400-fache Vergrößerung).

In der Durchlichtaufnahme erkennt man das fein ausgebildete Netzwerk von Nervenfasern, welche aus dem Ganglion herauswachsen. Sie bilden einen Kranz um das in der Mitte liegende Ganglion (braunes, kreisähnliches Gebilde). In den immunhistochemischen Färbungen ist die typische perl schnurartige Struktur der Nervenfasern zu erkennen.

## 4.2 Dichte von NPN-2-positiven Nervenfasern im Synovialgewebe

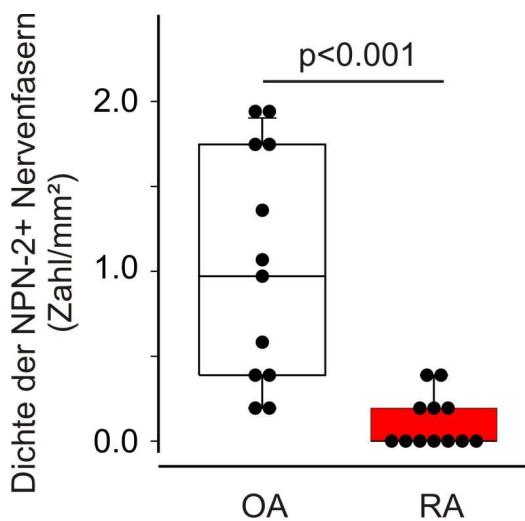
Das Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten wurde hinsichtlich der Anzahl der NPN-2-positiven sympathischen Nervenfasern untersucht. Bei Fluoreszenzfärbungen gegen die Tyrosinhydroxylase wurde bereits in der Gruppe von Prof. Straub der Verlust von Tyrosinhydroxylase-positiven sympathischen Nervenfasern im Synovialgewebe von RA-Patienten im Vergleich zu OA-Patienten nachgewiesen [105]. Da jedoch die Möglichkeit besteht, dass die Tyrosinhydroxylase durch den Entzündungsprozess herunterreguliert wird und überhaupt kein Verlust von sympathischen Nervenfasern vorliegt, wurde ein anderes Zielantigen, das NPN-2 (Kapitel 1.4.2), verwendet.



**Abb. 4.2: Fluoreszenzfärbung von NPN-2-positiven sympathischen Nervenfasern**

Sowohl bei OA- als auch bei RA-Patienten waren NPN-2-positive Nervenfasern sichtbar. Bei der Kontrolle ohne primären Antikörper ist keinerlei Färbung zu erkennen. Vergrößerung 400x

Die quantitative Bestimmung der NPN-2-positiven Nervenfasern im Synovialgewebe der Patienten ergab das gleiche Bild wie die Färbung gegen die Tyrosinhydroxylase. Sowohl im Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten waren Nervenfasern zu erkennen. Die Dichte der Nervenfasern war jedoch bei den RA-Patienten im Vergleich zu OA-Patienten signifikant erniedrigt (Abb. 4.3).



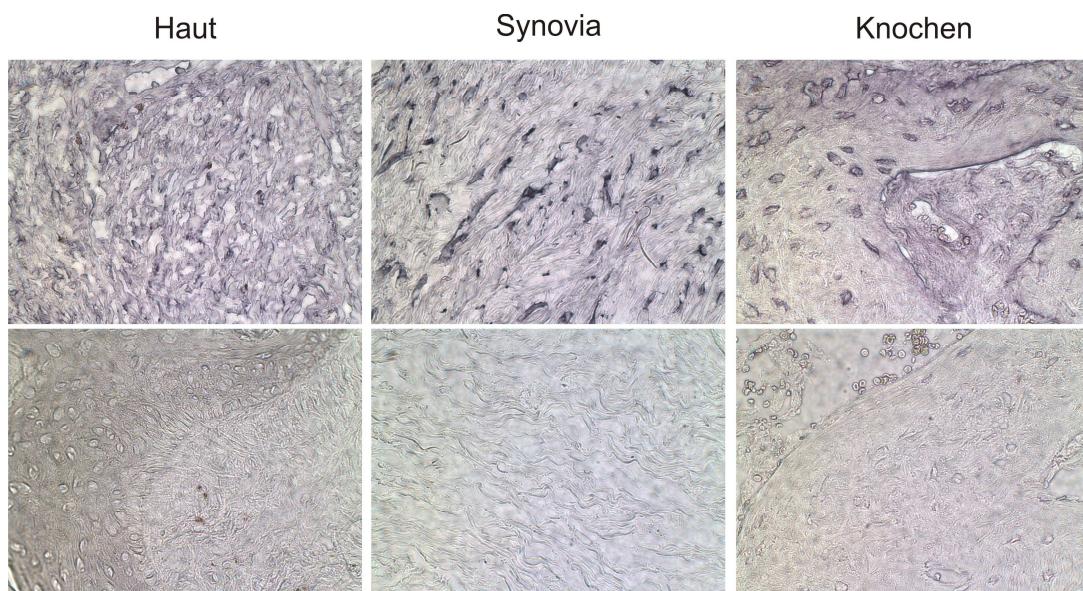
**Abb. 4.3: Dichte der NPN-2-positiven sympathischen Nervenfasern im Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten**

Die Zahl der Nervenfasern ist bei den RA-Patienten im Vergleich zu OA-Patienten signifikant erniedrigt. Jedes schwarze Symbol repräsentiert den Mittelwert von 17 ausgezählten Gesichtsfeldern eines Patienten. Die Box-Plots stellen die 10., 25., 50. (Median), 75., und 90. Perzentilen dar.

### 4.3 Histochemische Färbung von Semaphorin 3C und Semaphorin 3F bei RA-Patienten und anderen Autoimmunerkrankungen

In einer vorherigen Arbeit über den Repulsionsfaktor Semaphorin 3C konnte im Labor von Prof. Straub bereits gezeigt werden, dass dieser Faktor bei dem Rückzug von sympathischen Nervenfasern aus dem Entzündungsgebiet eine wichtige Rolle spielen könnte. Die immunhistochemische Analyse von Semaphorin 3C im Synovialgewebe von Patienten ergab nämlich, dass die Dichte von Semaphorin 3C-positiven Zellen bei RA-Patienten gegenüber anderen Kollektiven erhöht ist und die Dichte der Semaphorin 3C-positiven Zellen negativ mit der Dichte der Sympathikusfasern korreliert [217].

Für die Untersuchung, ob Semaphorin 3C auch bei anderen Autoimmunkrankheiten beteiligt sein könnte, wurden immunhistochemische Untersuchungen an Patienten mit Charcot-Syndrom durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben, dass auch bei diesen Patienten Semaphorin 3C vor allem im Synovialgewebe und im Knochen des Fußgelenkes zu finden waren (Abb. 4.4). In der Haut dagegen war er nur in sehr geringen Mengen zu finden.



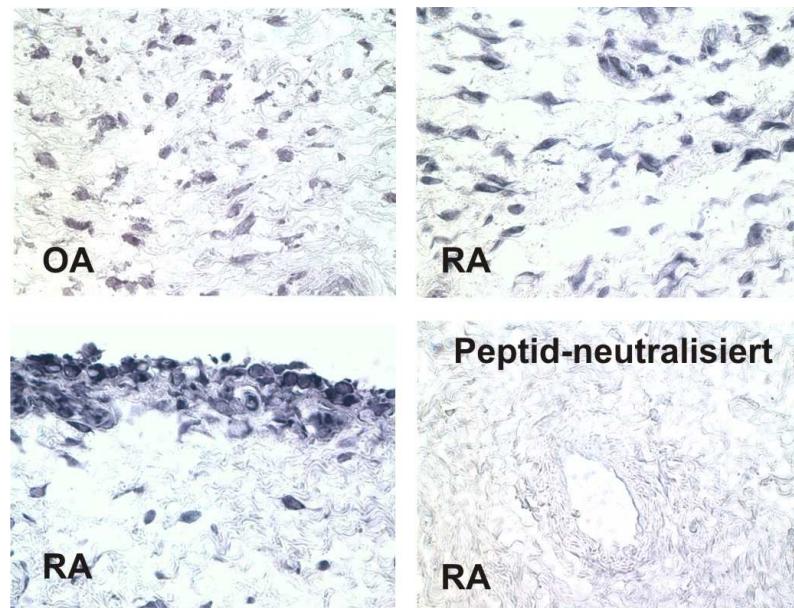
**Abb. 4.4: Immunhistochemische Färbung des Semaphorin 3C**

In der Haut waren nur sehr geringe Mengen an Semaphorin 3C zu finden, wohingegen im Synovialgewebe und im Knochen sehr viele Semaphorin 3C-positive Zellen detektierbar waren. Die untere Bildreihe stellt jeweils die Kontrolle dar. Vergrößerung 400x

Beim Charcot-Syndrom handelt es sich um eine Sonderform des diabetischen Fußsyndroms, welches auf eine Neuropathie (Schädigung von Nervenbahnen) zurückzuführen ist, und an dem Schätzungen zufolge ca. 16% aller Diabetiker erkrankt sind.

Dies ist ein interessantes Indiz dafür, dass die Semaphorine auch bei anderen Krankheiten eine wichtige Rolle spielen könnten.

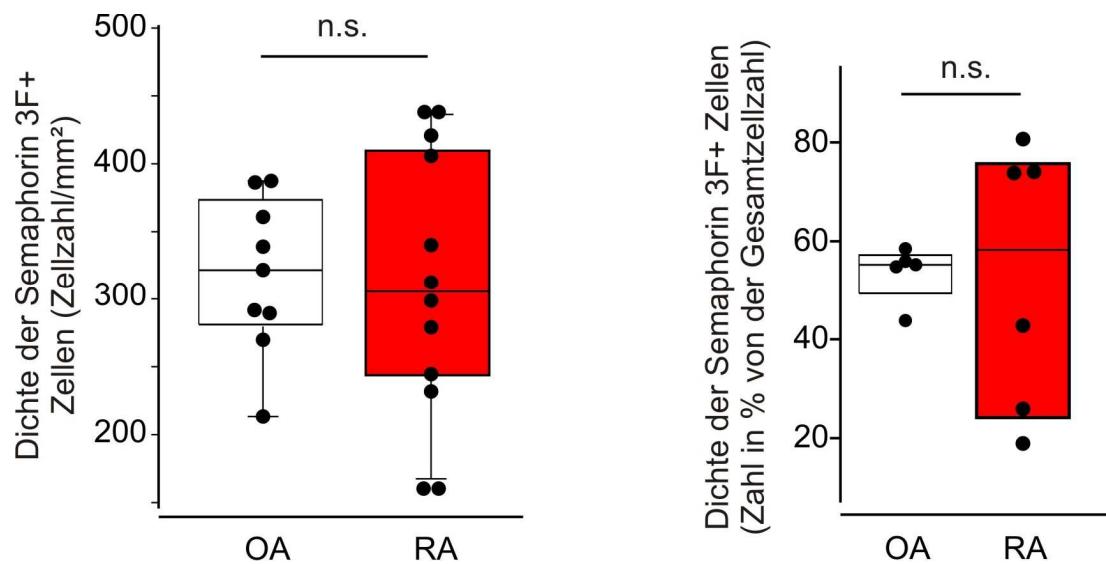
Aufgrund der Tatsache, dass Semaphorin 3C weder in käuflicher Weise zu erhalten ist, noch trotz großer Anstrengung hergestellt werden konnte (Probleme in der Herstellung und Löslichkeit des Proteins), wurden die weiteren Untersuchungen mit Semaphorin 3F durchgeführt. Dieses ist käuflich zu erwerben und hat verglichen mit dem Semaphorin 3C sehr ähnliche Eigenschaften hinsichtlich der Wirkung auf die Repulsion sympathischer Nervenfasern. Färbungen gegen Semaphorin 3F im Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten ergaben, dass sowohl im Synovialgewebe von RA- als auch von OA-Patienten Zellen gefunden wurden, die positiv für Semaphorin 3F waren (Abb. 4.5).



**Abb. 4.5: Semaphorin 3F-positive Zellen im Synovialgewebe von OA- und RA-Patienten**

Die Färbungen stellen eine Alkalische Phosphatase-Färbung dar. Im unteren rechten Bild ist die Kontrolle gezeigt, bei der der primäre Antikörper mit dem immunisierenden Peptid vorinkubiert wurde, was zur Neutralisierung des Antikörpers führte. Vergrößerung 400x

Die Semaphorin 3F-positiven Zellen wurden sowohl in der Deckschicht als auch im Bereich unterhalb der Deckschicht lokalisiert. Es war jedoch kein signifikanter Unterschied in der Zahl der Semaphorin 3F-positiven Zellen zwischen RA- und OA-Patienten detektierbar (Abb. 4.6). Auch im Verhältnis zur Gesamtzellzahl gab es keinen Unterschied (Abb. 4.6).



**Abb. 4.6: Dichte der Semaphorin 3F-positiven Zellen im Synovialgewebe von OA- und RA-Patienten**

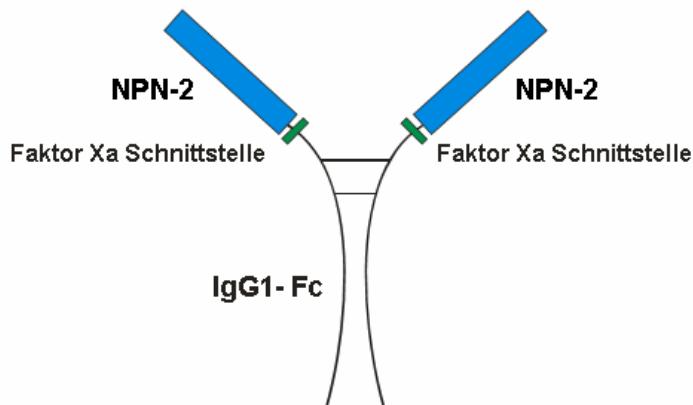
In der linken Abbildung ist die Dichte der Semaphorin 3F-positiven Zellen in der Gesamtzahl aufgetragen, wohingegen in der rechten Abbildung die Zahl der positiven Zellen in Prozent relativ zur Gesamtzellzahl zu sehen ist.

Auffällig ist, dass die Dichte der Semaphorin 3F-positiven Zellen zwischen den einzelnen Patienten sehr stark variiert.

## 4.4 NPN-2 Fc-Fusionskonstrukt

### 4.4.1 Klonierung des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukts

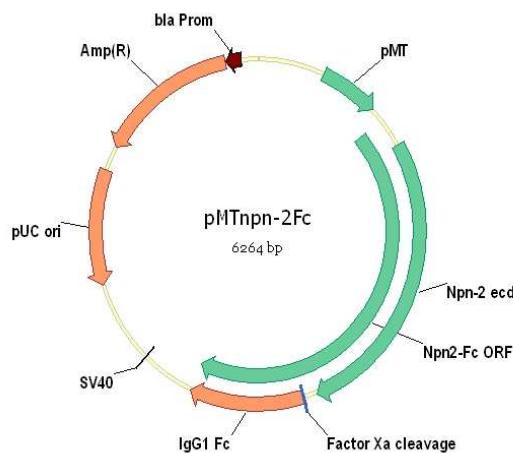
Wie bereits erwähnt, erfolgte die Klonierung des NPN-2 Fc-Fusionskonstrucks (NPN-2fc) durch die Arbeitsgruppe von Prof. Falk an der Uniklinik Regensburg. Dies war nötig, da dieses Konstrukt zwar käuflich zu erwerben war, es aber aus Kostengründen nicht möglich gewesen wäre, entsprechend hohe Mengen dieses Konstrucks für die *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen zu kaufen. Die Kopplung des NPN-2 an ein humanes IgG-Fc-Fragment (Abb. 4.7) diente der vereinfachten Reinigung aus Zellüberständen und der höheren Effektivität im Tiermodell aufgrund einer verlängerten Bluthalbwertszeit.



**Abb. 4.7: Schematische Darstellung des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukts**

Eine Art der Dimerisierung des Proteins erfolgte über ein humanes IgG1-Fc-Fragment.

Die Klonierung erfolgte in einem pMT/BiP-Vektor (Invitrogen). Dieser Vektor verfügt über einen insektenspezifischen Metallothioneinpromotor, der eine induzierbare Expression erlaubt, und eine BiP-Signalsequenz, wodurch das gewünschte Protein in den Zellüberstand sezerniert wird.



**Abb. 4.8: NPN-2fc im Expressionsvektor pMT/BiP**

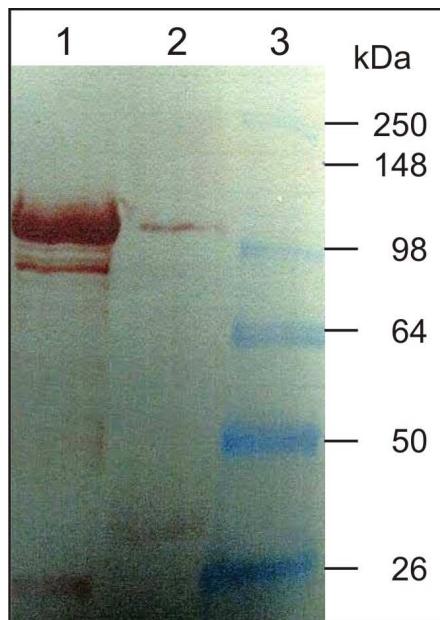
Die NPN-2fc DNA-Sequenz wurde in das Leseraster der BiP-Signalsequenz des pMT-Vektors eingefügt. Mit diesem Vektor wurden anschließend Insektenzellen (Schneider S2 Zellen) transfiziert. Das NPN-2fc wurde von den Zellen ins Medium sezerniert.

#### 4.4.2 Expression und Reinigung des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukts

Die Expression erfolgte in der *Drosophila*-Zelllinie Schneider S2. Diese Insektenzelllinie ermöglicht eine relativ einfache und effektive Gewinnung von

Protein. Die Vorteile liegen in der anspruchslosen Kultivierung, die ohne zusätzliche Befeuchtung und CO<sub>2</sub>-Begasung bei Temperaturen zwischen 21° C und 28° C erfolgt. Darüber hinaus wird spontan eine überdurchschnittlich hohe Anzahl von Genkopien in eine einzelne S2-Zelle eingebaut, was zu hohen Ausbeuten in der Proteinproduktion führen kann.

Die gewonnene Proteinfraktion wurde in einem SDS-Gel analysiert.



**Abb. 4.9: Expression des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukts in S2-Zellen**

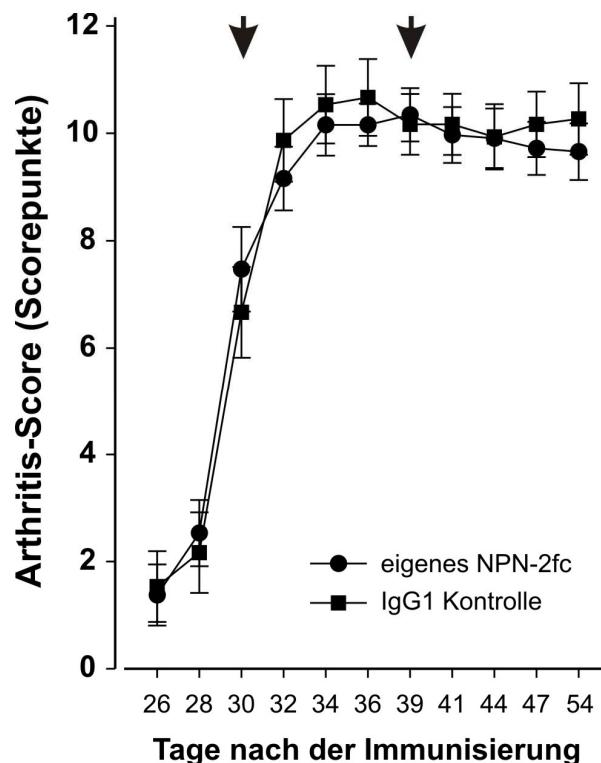
Gereinigtes NPN-2fc (Spur 1) und Überstand von NPN-2fc-transfizierten Zellen (Spur 2) wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch einen anti-NPN-2-Antikörper. Als Größenstandard wurde der SeeBlue® Plus2 Größenstandard (Spur 3) verwendet.

Die Bande des Konstrukts zeigte sich bei ca. 120 kDa. In der aufgereinigten Probe ist relativ viel Protein zu erkennen, wohingegen im Zellüberstand nur eine sehr dünne Bande zu erkennen ist. Die genaue Proteinkonzentration wurde mit dem Agilent Protein 230 Kit gemessen. Die gereinigten Proteinkonzentrationen waren sehr gut und bewegten sich im Bereich zwischen 200 und 700 µg/ml.

## 4.5 Einsatz des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukts im Tiermodell

Zur Überprüfung der Funktionalität des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukts (NPN-2fc) bei der RA diente ein Tiermodell. Dazu wurde in männlichen DBA/1 Mäusen eine experimentelle Kollagen Typ II Arthritis induziert. An den Tagen 31 und 39 nach Arthritisinduktion wurden den Mäusen 25 µg vom selbst hergestellten NPN-2 Fc-

Fusionskonstrukt intravenös appliziert. Kontrolltiere erhielten humanes IgG1 gespritzt. Zwischen beiden Gruppen konnte jedoch bis Tag 55 nach der Arthritisinduktion kein signifikanter Unterschied im Verlauf der Arthritis festgestellt werden (Abb. 4.10). Das Konstrukt bewirkte weder eine Verbesserung noch eine Verschlechterung des Krankheitsverlaufes bei den Tieren.

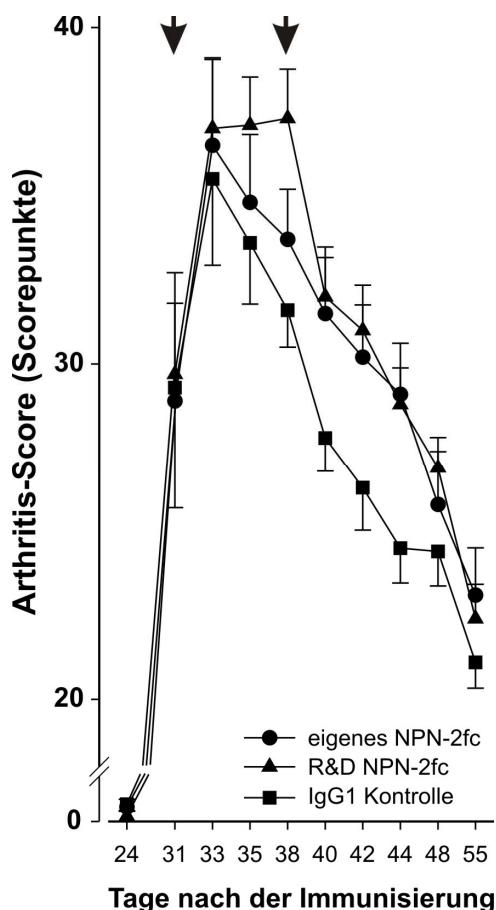


**Abb. 4.10: Einfluss des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukts auf den Verlauf einer Kollagen Typ II induzierten Arthritis in Mäusen**

Jede Gruppe bestand aus 10 Tieren. Die Tiere erhielten am Tag 30 und 39 nach Arthritisinduktion 25 µg vom selbst hergestellten NPN-2fc intravenös appliziert. Als Score wurde der Score Nr. 1 mit maximal 12 Punkten pro Tier verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte ± SEM dar. Der Unterschied war für beide Gruppen nicht signifikant.

Da es sich aber in der Praxis herausgestellt hat, dass mit dem Arthritis-Score Nr. 1 nur sehr große Unterschiede im Arthritisverlauf sichtbar werden und kleinere Veränderungen nicht erfasst werden, wurde für den nächsten Tierversuch der Arthritis-Score Nr. 2 verwendet. Mit diesem konnte man z.B. erkennen, dass zwei von 4 Zehen eine Linderung zeigten, die übrigen aber noch den Ursprungszustand aufwiesen. Dieser Score ermöglichte also präzisere Feststellungen. Auf den Menschen bezogen stellt ja eine Linderung der Entzündung an einigen Gelenken bereits einen therapeutischen Effekt dar. Außerdem wurde die applizierte Menge des

NPN-2fc von 25 µg auf 50 µg verdoppelt. Zusätzlich wurde neben dem selbst hergestellten NPN-2fc ein von der Firma R&D kommerziell erhältliches NPN-2fc eingesetzt. Überraschenderweise verursachten beide eingesetzten Konstrukte eine Verschlimmerung der Arthritis im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4.11).



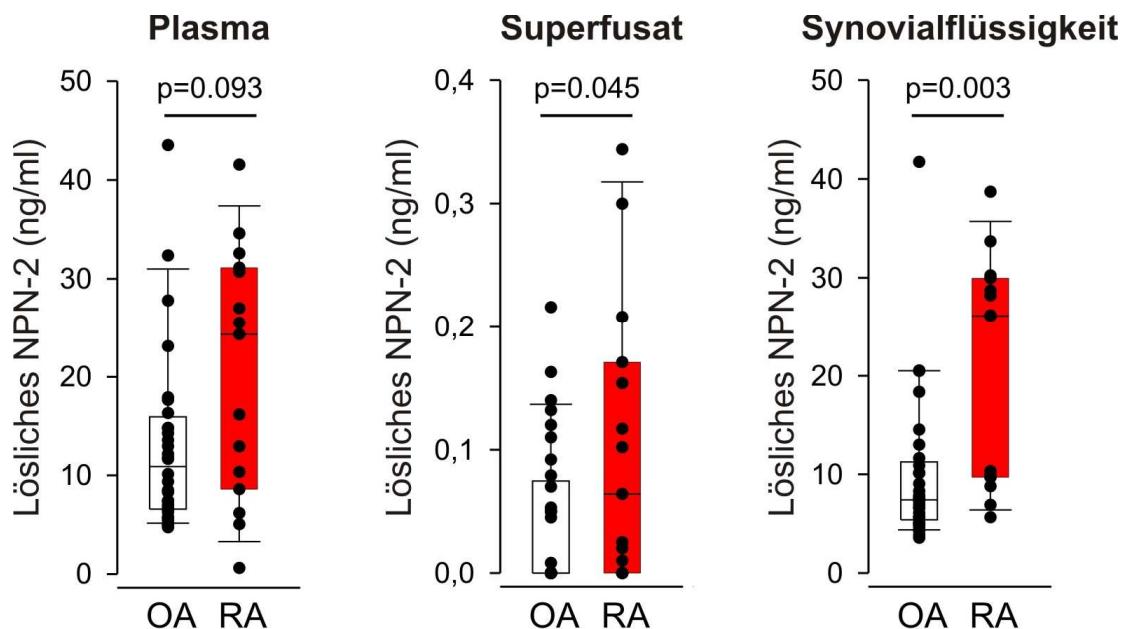
**Abb. 4.11: Einfluss des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukts auf den Verlauf einer Kollagen Typ II induzierten Arthritis in Mäusen**

Jede Gruppe bestand aus 10 Tieren. Eine Gruppe erhielt am Tag 31 und 38 nach Arthritisinduktion 50 µg vom selbst hergestellten NPN-2fc, die andere Gruppe dieselbe Menge an kommerziell erworbenem NPN-2fc intravenös appliziert. Als Score wurde der Score Nr. 2 mit maximal 48 Punkten pro Tier verwendet. Mit dem General Linear Modell konnte eine Signifikanz von  $p < 0.001$  zwischen Kontrolltieren und Tieren, die mit dem kommerziell erhältlichen NPN-2fc behandelt wurden und eine Signifikanz von  $p < 0.016$  zwischen Kontrolltieren und Tieren, die mit dem selbst hergestellten NPN-2fc behandelt wurden, ermittelt werden. Zwischen den beiden mit NPN-2fc-behandelten Gruppen war der Unterschied nicht signifikant.

## 4.6 Lösliches NPN-2 in Körperflüssigkeiten

Nachdem zwischen RA- und OA-Patienten kein signifikanter Unterschied in der Dichte von Semaphorin 3F-positiven Zellen festgestellt werden konnte und das NPN-2fc im Arthritismodell den Krankheitsverlauf verschlimmerte, wurden die

Konzentrationen der löslichen Form des Semaphorin 3F-Rezeptors, das lösliche NPN-2, untersucht. Wegen des Rückzugs sympathischer Nervenfasern bei RA wurden in OA-Patienten höhere Konzentrationen an löslichem NPN-2 sowohl im Plasma als auch in der Synovialflüssigkeit und im Superfusat bei RA-Patienten erwartet. Dieses lösliche NPN-2 stellt im Prinzip das NPN-2 Fc-Fusionskonstrukt dar und könnte für ein Abfangen der Semaphorine relevant sein. Damit würde es dem angedachten Therapieprinzip entsprechen und verhindern, dass die Semaphorine an den membrangebundenen NPN-2 Rezeptor auf der Oberfläche von sympathischen Nervenfasern binden können. Mittels eines ELISAs wurden die Konzentrationen des löslichen NPN-2 im Plasma, der Synovialflüssigkeit und im Superfusat von Patienten gemessen. Überraschenderweise war hier gerade das Gegenteil zu beobachten. Im Superfusat und der Synovialflüssigkeit der RA-Patienten waren die Konzentrationen an löslichem NPN-2 statistisch signifikant höher als in den OA-Patienten. Die Konzentrationen im Plasma dagegen waren statistisch nicht signifikant höher (Tendenz) (Abb. 4.12).

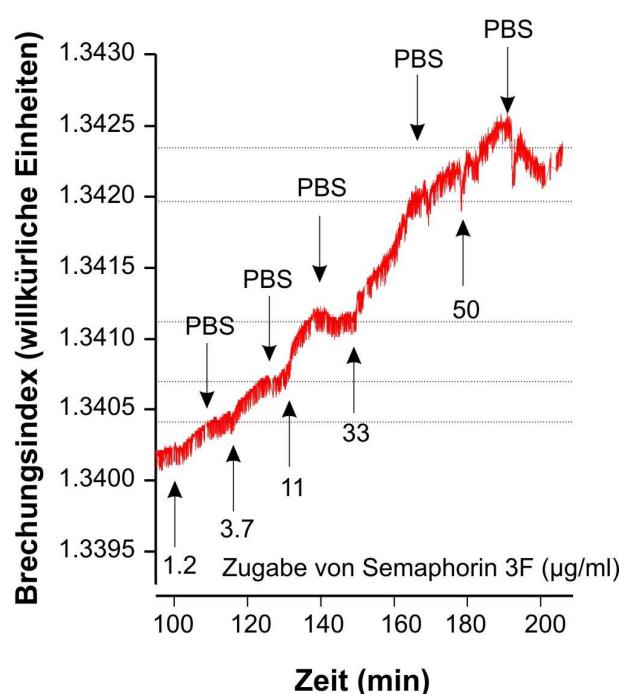


**Abb. 4.12: Die Konzentration an löslichem NPN-2 in verschiedenen Körperflüssigkeiten**

Sowohl im Plasma als auch im Superfusat und der Synovialflüssigkeit sind die Konzentrationen von löslichem NPN-2 bei RA-Patienten im Vergleich zu OA-Patienten erhöht. Zu beachten ist die veränderte Skalierung in der Graphik zur Superfusat-Probe. Hier ist die Konzentration an löslichem NPN-2 im Vergleich zu den beiden anderen gemessenen Proben gering, was auf den Verdünnungseffekt des Superfusionsmediums zurückzuführen ist. Allerdings bewegten sich die Werte noch im Detektionslimit von 30 pg/ml.

## 4.7 Bindungseigenschaften zwischen Semaphorin 3F und NPN-2 Fc-Fusionskonstrukt

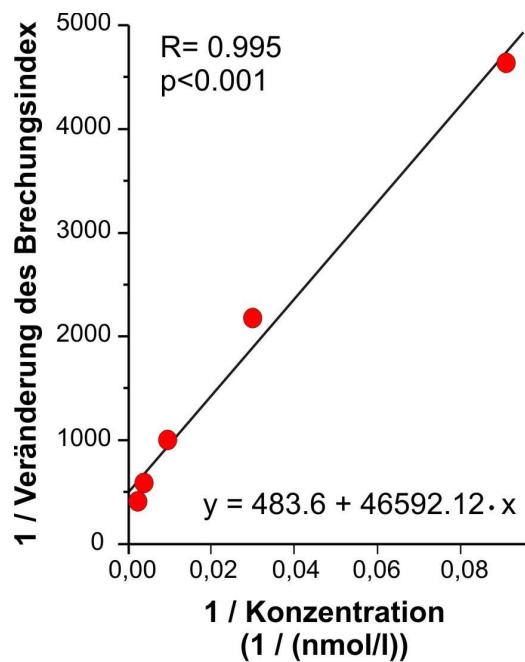
Für die Ermittlung der Bindungskonstante zwischen den beiden Proteinen Semaphorin 3F und dem hergestellten NPN-2 Fc-Fusionskonstrukt (NPN-2fc) wurde die Methode der Oberflächenplasmonresonanz genutzt. Sie wurde unter Mithilfe von Dr. Hirsch und Prof. Mirsky am Institut für Analytische Chemie der Universität Regensburg angewandt. Diese Methode ermöglicht eine sehr elegante Messung der Interaktion zwischen zwei Interaktionspartnern (Kapitel 3.6). Der Rezeptor, das NPN-2fc, wurde hierfür an eine Goldoberfläche gebunden. Die anschließende Zugabe versch. Konzentrationen an Semaphorin 3F führte durch die Bindung an das immobilisierte NPN-2 zu einer Änderung des Brechungsindex, der gemessen wurde. In Abb. 4.13 erkennt man den konzentrationsabhängigen Anstieg des Brechungsindex. Je höher die Konzentration am zugegebenen Semaphorin 3F ist, desto höher ist der Brechungsindex. Vor jeder neuen Zugabe von Semaphorin 3F erfolgte ein Waschgang mit PBS.



**Abb. 4.13: Analyse der Bindungseigenschaften von NPN-2fc und Semaphorin 3F**

Nach der kovalenten Bindung von NPN-2fc an der Sensoroberfläche erfolgte die Zugabe versch. Konzentrationen von Semaphorin 3F. Zwischen den versch. Zugaben von Semaphorin 3F erfolgte ein Waschgang mit PBS, der den Brechungsindex auf ein neues Ausgangsniveau brachte (gepunktete Linie).

Die Erhöhung des Brechungsindex durch die Zugabe versch. Konzentrationen an Semaphorin 3F ist gut zu erkennen (Abb. 4.13). Mit Hilfe des Lineweaver-Burk Diagramms kann die Bindungskonstante ermittelt werden. Dazu wird der x-Wert, an dem die Regressionslinie die x-Achse ( $y=0$ ) schneidet, zur Ermittlung der Bindungskonstante herangezogen. Für die Bestimmung der Bindungskonstante wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Auf diese Weise konnte eine Bindungskonstante von 96 nmol/l bestimmt werden.



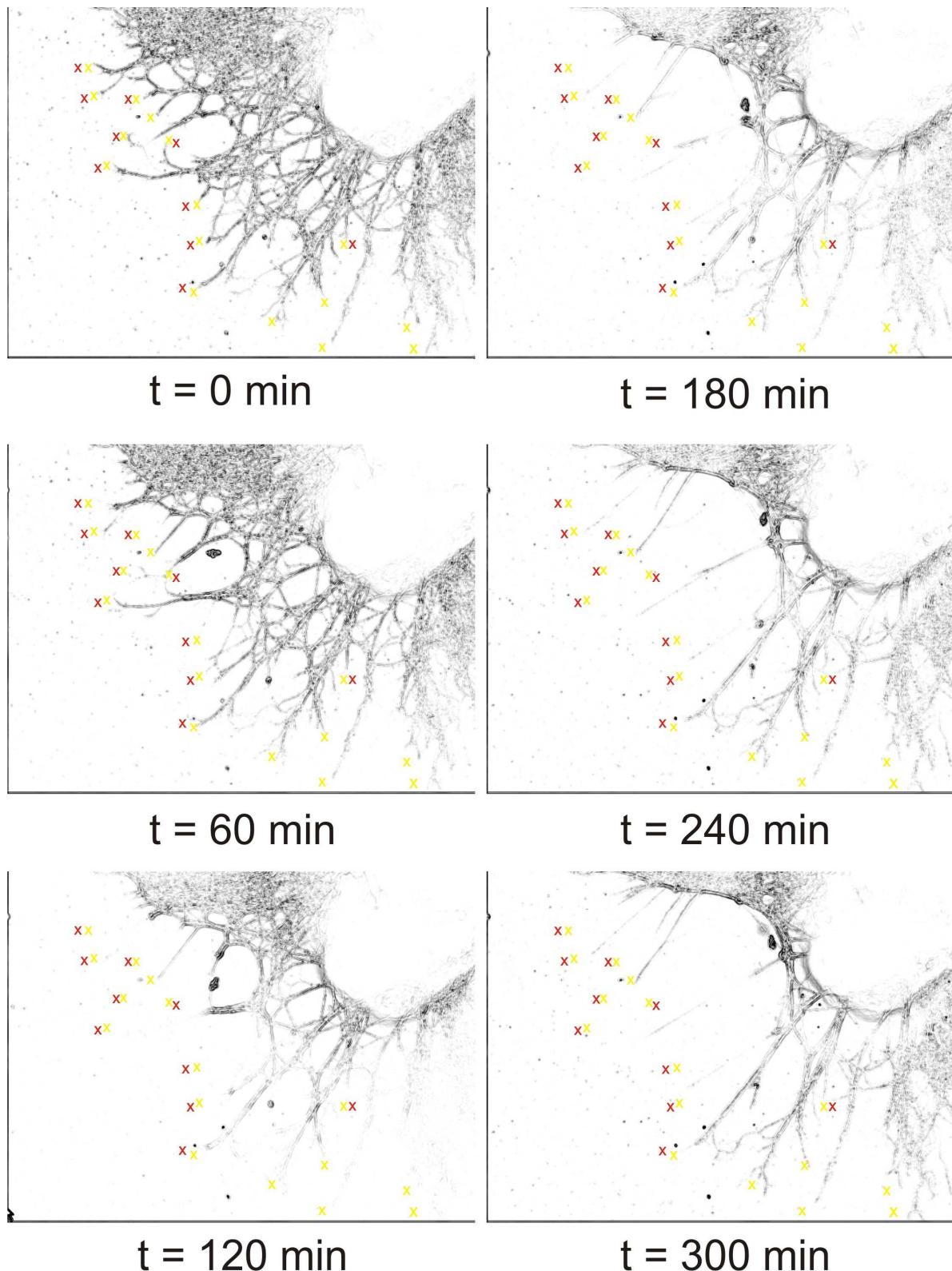
**Abb. 4.14: Bindungskurve in Form des Lineweaver-Burk Diagramms**

In der Graphik ist die Regressionslinie, der Regressionskoeffizient  $R$  und dessen  $p$ -Wert angegeben. Der Wert, an dem die Regressionslinie die x-Achse schneidet, stellt die Bindungskonstante dar. Sie liegt im Bereich von 96 nmol/l.

## 4.8 Effekte von Semaphorin 3F im Neuriten-Auswachs-Assay

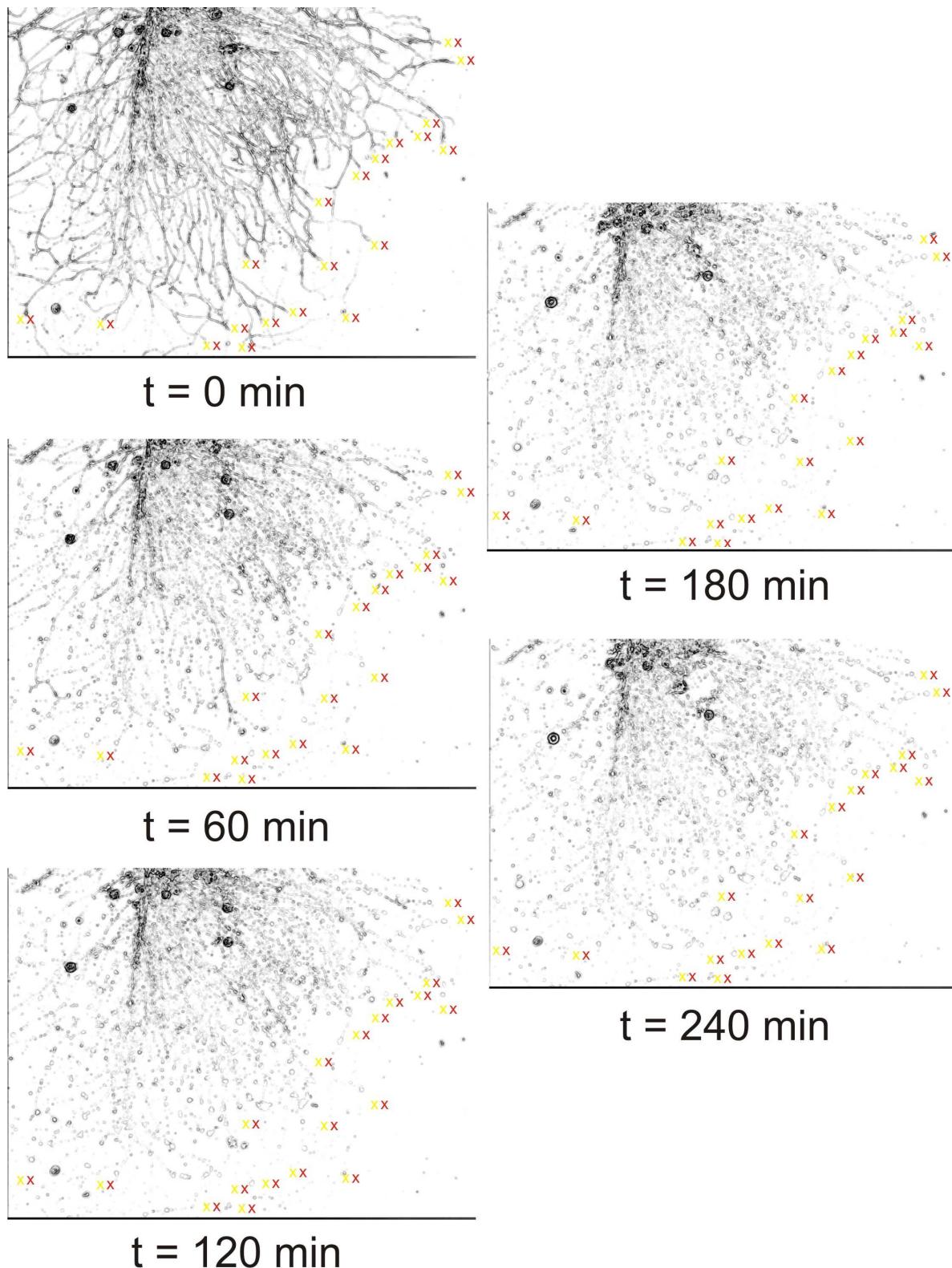
Nachdem mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz die Interaktion zwischen Semaphorin 3F und NPN-2 bestätigt wurde, wurden die Effekte von Semaphorin 3F im Neuriten-Auswachs-Assay getestet. Dieser Assay musste erst entwickelt werden, was einen Großteil der Arbeit in Anspruch nahm. In diesem Assay wurden die sympathischen paravertebralen Grenzstrangganglien von zwei Tage-alten Mäusen ausgebaut und mit Hilfe von NGF und einem speziellen Wachstumsmedium auf Poly-

D-Lysin beschichteten *culture slides* zum Wachstum angeregt. Bereits nach einem Tag begannen die Nervenfasern auszuwachsen. Zwei Tage nach Ausbau der Ganglien waren sie bereits soweit ausgewachsen, dass sie für funktionelle Tests herangezogen werden konnten. Der große Nachteil ist, dass trotz vieler Veränderungen im Versuchsaufbau nur ca. 25% der kultivierten Ganglien überhaupt ausgewachsen sind. Davon wuchs wiederum nur 1/3 der Ganglien soweit aus, dass sie ein feines Netzwerk von Nervenfasern bildeten und für die Tests verwendet werden konnten. Nach Zugabe einer hohen Konzentration von 210 nmol/l Semaphorin 3F wurden die Nervenfasern mit Hilfe der Zeitraffer-Videomikroskopie über 5 h beobachtet. Es zeigten sich zwei Arten von Nervenfaserrepulsion, einen fulminanten Rückzug von Nervenfasern und ein Trümmerfeldrückzug (Abb. 4.15 und Abb. 4.16). Der Trümmerfeldrückzug war in 95% der Fälle zu beobachten, wobei der fulminante Rückzug nur in ca. 5% der Fälle zu erkennen war. Während des fulminanten Rückzugs zogen sich die Nervenfasern komplett zurück, wobei nur einige wenige Nervenfasern zurückblieben. Im Fall des Trümmerfeld-Rückzugs zogen sich die Nervenfasern zurück und hinterließen dabei viele abgeschnürte vesikuläre Axonfragmente. Diese Fragmente ähnelten den sogenannten Synaptosomen, die bereits in den 60er Jahren beschrieben wurden [218]. Die Gründe für die eine oder andere Art des Rückzugs sind bisher noch nicht verstanden. Die Markierung der ausgewachsenen Nervenfasern mit gelben bzw. roten Kreuzen diente der Quantifizierung der zurückgezogenen Nervenfasern. Zu Anfang des Experiments wurden die Enden der ausgewachsenen Nervenfasern mit einem gelben Kreuz markiert und am Ende des Experiments (nach 5 h) die zurückgezogenen mit einem roten Kreuz (Abb. 4.15 und Abb. 4.16).



**Abb. 4.15: Semaphorin 3F-induzierter fulminanter Rückzug von Nervenfasern**

Gezeigt sind die Aufnahmen zu versch. Zeitpunkten nach der Zugabe des Semaphorins. Die roten und gelben Markierungen dienten der Quantifizierung der zurückgezogenen Nervenfasern. Vergrößerung 100x

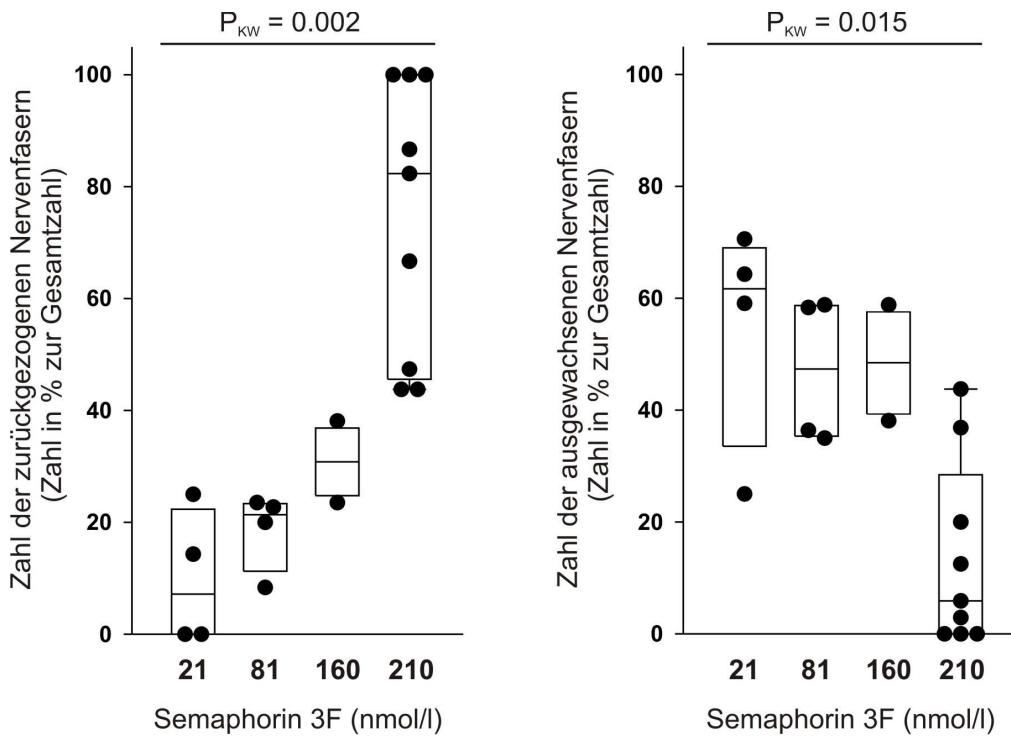


**Abb. 4.16: Semaphorin 3F-induzierter Trümmerfeldrückzug von Nervenfasern**

Gezeigt sind die Aufnahmen zu versch. Zeitpunkten nach der Zugabe des Semaphorins. Die Nervenfasern verschwanden, wobei sie viele abgeschnürte vesikuläre Axonfragmente zurückließen. Vergrößerung 100x

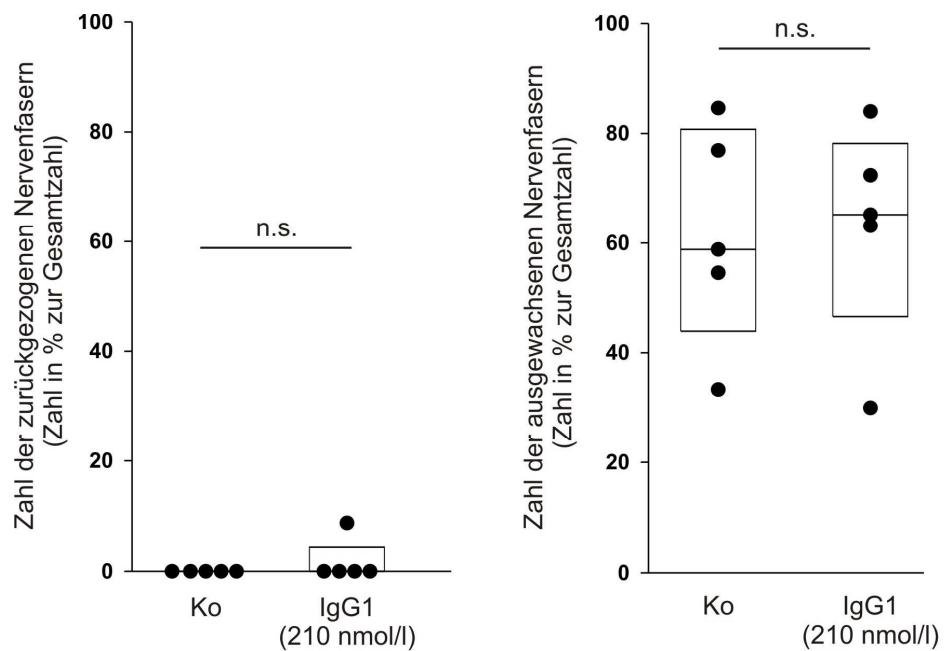
#### 4.9 Dosisabhängige Effekte von Semaphorin 3F mit und ohne NPN-2 Fc-Fusionskonstrukt

Nachdem der Neuriten-Auswachs-Assay entwickelt werden konnte und die Bindungskonstante der zwei Interaktionspartner NPN-2 und Semaphorin 3F bestimmt wurde, wurden dosisabhängige Effekte von Semaphorin 3F und der Einfluss des NPN-2 Fc-Konstrukts (NPN-2fc) auf das Verhalten der Nervenfasern getestet. Semaphorin 3F übte eine repulsive Wirkung in einer dosisabhängigen Form auf die sympathischen Nervenfasern aus (Abb. 4.17). Sowohl der Rückzug als auch das Auswachsen der Nervenfasern wurde mit der in Kapitel 4.8 dargestellten Methode quantifiziert. Der halbmaximale Effekt des Semaphorin 3F lag zwischen 160 und 210 nmol/l (Abb. 4.17). Dieser Wert liegt etwa im Konzentrationsbereich, der als Bindungskonstante mit der Oberflächenplasmonresonanz (96 nmol/l) ermittelt wurde. Durch die gleichzeitige Betrachtung des Rückzugs und des Auswachsens ist zu erkennen, dass sich die Kurven des Rückzugs und des Auswachsens wie erwartet entgegengesetzt verhalten (Abb. 4.17). Bei den Konzentrationen, bei denen die Nervenfaserrepulsion erhöht wurde, wurde das Auswachsen der Nervenfasern gehemmt und andersherum. Kontrollexperimente, die entweder ohne die Zugabe von irgendeinem Faktor oder mit IgG1 allein durchgeführt wurden, zeigten keinerlei Beeinflussung hinsichtlich des Rückzugs oder des Auswachsens der Nervenfasern (Abb. 4.18). Der Fc-Teil des Konstrukts ist also nicht für den Rückzug der Nervenfasern verantwortlich.



**Abb. 4.17: Dosisabhängige Stimulation der Repulsion/des Auswachsens sympathischer Nervenfasern durch Semaphorin 3F**

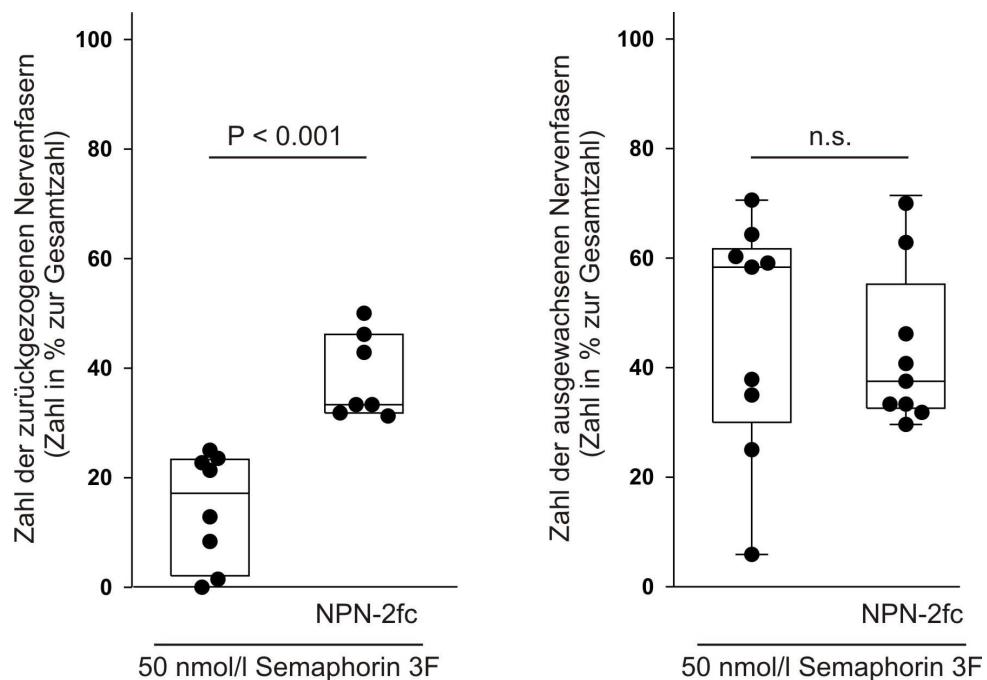
Aufgetragen ist die Anzahl der zurückgezogenen bzw. ausgewachsenen Nervenfasern in Prozent zur Gesamtzahl der Nervenfasern. Jede Markierung im Box-Plot stellt die Messung der Nervenfasern eines Ganglions über 5 h mit der Zeitraffer-Videomikroskopie dar. Für die Ermittlung des *p*-Wertes wurde der Kruskal-Wallis Test herangezogen.



**Abb. 4.18: Verhalten der Nervenfasern bei Zugabe von IgG1**

Zur Kontrolle wurde das Verhalten der Nervenfasern bei Zugabe von IgG1 beobachtet. Es zeigte sich, dass dadurch überhaupt kein Rückzug der Nervenfasern induziert wurde und die Nervenfasern weiter auswuchsen. Abkürzungen: IgG1: Immunglobulin G1; Ko: Kontrolle

In weiteren Versuchen wurde die kombinierte Gabe von Semaphorin und NPN-2fc untersucht. Dafür wurden beide Interaktionspartner vor Zugabe für eine halbe Stunde zusammen inkubiert. Wie relativ deutlich zu erkennen ist, erhöhte die begleitende Gabe von NPN-2fc die Repulsion, hatte aber keinen Einfluss auf das Auswachsverhalten der Nervenfasern. Somit unterstützte das NPN-2fc die vom Semaphorin 3F-induzierte Nervenfaserrepulsion.



**Abb. 4.19: Stimulation der Semaphorin 3F-induzierten Nervenfaserrepulsion durch NPN-2fc**

Die kombinierte Gabe von Semaphorin 3F und NPN-2fc erhöhte die Repulsion der Nervenfasern, hatte jedoch keinen Einfluss auf das Auswachsen. Die Konzentration am Semaphorin 3F betrug 50 nmol/l, um eine mögliche Veränderung bei Zugabe von NPN-2fc in beide Richtungen erfassen zu können. Die molare Konzentration des NPN-2fc betrug das 3,5-fache der molaren Semaphorin 3F-Konzentration, also 175 nmol/l.

## 5 Diskussion

### 5.1 Nachweis der Tyrosinhydroxylase und des NPN-2 auf sympathischen Ganglien im Matrikel

Das Nervensystem ist nachweislich eng mit dem Immunsystem verknüpft. Zwischen beiden Systemen besteht eine rege Interaktion. So werden Rezeptoren auf Nervenzellen durch Zytokine stimuliert, die von Lymphozyten und Makrophagen produziert werden [219]. Andererseits tragen Lymphozyten auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, die neben den klassischen Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems, das Noradrenalin, auch das vasoaktive intestinale Peptid (VIP), Neuropeptid Y, ATP/Adenosin und Dopamin binden können. Für alle diese Neurotransmitter, die zusammen mit Noradrenalin aus sympathischen Nervenendigungen freigesetzt werden können, konnten Rezeptoren auf Immunzellen nachgewiesen werden [220; 221]. Außerdem gibt es Hinweise, dass Nervenzellen Zytokine und Lymphozyten Transmitter produzieren können [222].

Da der Ausbau der sympathischen Ganglien aus Mäusen für den Anfänger nicht so einfach ist, wurde durch die Färbung gegen die Tyrosinhydroxylase überprüft, ob es sich bei den ausgebauten Ganglien wirklich um sympathische Ganglien handelt und nicht etwa um sensible Ganglien. Anhand der positiven Färbung konnte sichergestellt werden, dass es sich bei den ausgebauten Ganglien wirklich um die sympathischen Ganglien handelte. Außerdem wurde gezeigt, dass der zur Verfügung stehende Antikörper gegen NPN-2 für Färbungen von sympathischen Nervenfasern eingesetzt werden kann. Bisher identifizierte man die sympathische Innervation von Gewebe fast ausschließlich durch den immunhistologischen Nachweis der für die Noradrenalinsynthese notwendigen Enzyme Tyrosin-Hydroxylase (TH) und Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (DBH). Die Tyrosin-Hydroxylase wandelt Tyrosin in L-Dopa um, wohingegen die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase für die Katalyse der Umwandlung von Dopamin in Noradrenalin zuständig ist. Eine andere Möglichkeit wäre die Anfärbung des für die vesikuläre Verpackung und Freisetzung von Noradrenalin notwendigen vesikulären Monoamintransporter Typ 2 (VMAT2).

Der Nachweis des Verlustes sympathischer Nervenfasern bei Patienten mit RA und anderen entzündlichen Krankheiten wurde bisher fast ausschließlich mit Färbungen

gegen die Tyrosinhydroxylase erbracht [105; 223; 224]. Das Ergebnis der Färbungen gegen den Rezeptor NPN-2 bestätigte den Verlust der sympathischen Nervenfasern im entzündeten Synovialgewebe von RA-Patienten, der bereits durch die Tyrosinhydroxylase-Färbungen festgestellt wurde. Auf diese Weise wurde mit einem zweiten Marker für sympathische Nervenfasern sichergestellt, dass es sich in der Tat um einen Verlust von sympathischen Nervenfasern handelt und nicht um eine eventuelle Herunterregulierung der Tyrosinhydroxylase. Diese Tatsache war für den Hintergrund der Arbeit sehr wichtig, da es ja bei dieser Arbeit darum ging, dem Verlust der sympathischen Nervenfasern entgegenzuwirken.

## 5.2 Bedeutung des NPN-2 Fc-Fusionskonstrukts in der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis

Die Idee der Verbesserung der Arthritis durch die Hemmung der Semaphorine durch ein lösliches NPN-2 Fc-Fusionskonstrukt (NPN-2fc) wurde im CIA Arthritis-Modell bei Mäusen getestet. Die Produktion des NPN-2fc in den Drosophila S2-Zellen war sehr erfolgreich und erzielte hohe Ausbeuten (zwischen 200-700 µg/ml) bei einer gleichzeitig hohen Reinheit des Proteins. Die Kopplung des NPN-2 an ein humanes IgG1-Fc-Fragment diente der Isolierung des Proteins aus Zellüberständen über eine Protein G-Affinitätschromatografie und führte zu einer verlängerten Halbwertszeit des Konstrukts *in vivo*. Obwohl es im sauren Milieu aus Protein G eluiert wurde, behielt es die Bindungsfähigkeit für Semaphorin 3F bei. Dies wurde mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz überprüft. Eine Ko-Immunpräzipitation zwischen NPN-2 und Semaphorin 3F war nicht möglich, da beide Proteine einen humanen IgG1 Fc-Teil enthielten. Somit konnte es nach der Bindung eines Interaktionspartners an Protein G und der Blockierung restlicher Bindestellen bei der Zugabe des anderen Interaktionspartners zu einem Austausch zwischen NPN-2 und Semaphorin 3F kommen. Diese Möglichkeit konnte nicht ausgeschlossen werden, weshalb auf die elegantere Methode der Oberflächenplasmonresonanz ausgewichen wurde. Die Fähigkeit der Oberflächenplasmonresonanz, die Interaktion zwischen einem immobilisierten Molekül auf der Oberfläche des Sensors und einem interagierenden molekularen Partner in Lösung zu messen, haben diese Methode seit den 90er Jahren zu einem wichtigen Werkzeug für die biomolekulare Interaktionsanalyse und die biomolekulare Forschung im Allgemeinen gemacht [225]. In jüngster Zeit werden

Oberflächenplasmonresonanz-Biosensoren vermehrt für die Detektion von chemischen und biologischen Substanzen verwendet, die eine Rolle in der medizinischen Diagnostik, der Umwelttechnologie und der Ernährungssicherheit haben [226]. Um die für eine effektive Bindung notwendigen Strukturen nicht zu zerstören, wurde das NPN-2 über seine Hydroxylgruppe an die Aminogruppe einer Monoschicht aus Alkanthiolen immobilisiert. Die durch die Oberflächenplasmonresonanz ermittelte Bindungskonstante von ca. 100 nmol/l bestätigte die funktionelle Bindungsfähigkeit von NPN-2fc an Semaphorin 3F und lieferte für die weiteren funktionellen Studien einen wichtigen Anhaltspunkt.

Die intravenöse Applikation von je 25 µg NPN-2fc am Tag 30 und 39 nach Arthritisinduktion zeigte keinen Unterschied hinsichtlich des Arthritis-Scores im Vergleich zu Kontrollmäusen. Bei einem weiteren Experiment mit der Applikation der doppelten Menge an NPN-2fc (50 µg) wurde ein Effekt sichtbar. Überraschenderweise zeigte sich aber nicht die erwartete Verbesserung des Arthritis-Schweregrades, im Gegenteil, es wurde eine Verschlechterung des Arthritis-Schweregrades durch das applizierte NPN-2fc beobachtet. Die Verschlimmerung der Arthritis durch eine mögliche durch den im NPN-2 enthaltenen menschlichen IgG Fc-Teil ausgelöste Immunstimulierung konnte ausgeschlossen werden, da die Kontrolltiere ebenfalls diesen Fc-Teil appliziert bekamen. Der Arthritis-Score ist ein, in der Literatur übliches, jedoch nicht einheitlich gehandhabtes Graduierungsschema [227]. Gängige Kriterien sind Rötungsgrade und Schwellung der betroffenen Pfoten und ihrer Gelenke. Die Graduierung der Schwellung in wenige Grade liefert erfahrungsgemäß reproduzierbare Ergebnisse. Der Nachteil des Arthritis-Scores ist allerdings, dass er nur eine Momentaufnahme des inflammatorischen Geschehens reflektiert. Er beschreibt nur den akuten makroskopischen Effekt der Inflammation, die erhöhte Gefäßpermeabilität und deren Folgen, wie die vermehrte Plasmaexsudation im Bereich der Entzündung. Somit sagt dieser Score nichts über die arthritistypischen morphologischen Veränderungen aus, die letztendlich für die Erkrankung bedeutend sind. Knochenerosion und Knorpeldestruktion werden nicht erfasst und somit eine Beurteilung von Veränderungen auf anatomischer morphologischer Ebene vernachlässigt. Wegen des negativen Ergebnisses wurde aber in diesem Fall auf die morphologische Betrachtung der Gelenke verzichtet. Der Zeitpunkt der Gabe des NPN-2fc wurde absichtlich in der symptomatischen Phase des Krankheitsprozesses verabreicht. Der Grund dafür war, dass aus früheren

Studien bereits bekannt war, dass das sympathische Nervensystem zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsprozesses einen sehr unterschiedlichen pro- bzw. anti-inflammatoryischen Einfluss ausübt [124]. In der Frühphase der Entzündung hat das sympathische Nervensystem eine pro-inflammatoryische Wirkung, während es in der Spätphase der Entzündung einen anti-inflammatoryischen Einfluss ausübt. Allerdings könnte und sollte noch überprüft werden, welche Auswirkung eine Gabe des NPN-2fc in der Frühphase bzw. vor der Induktion der Arthritis hat.

### **5.3 Neuriten-Wachstumsassay**

Die Entwicklung des Neuriten-Wachstumsassays stellte für die Untersuchung der sympathischen Nervenfasern die Schlüsselrolle der gesamten Arbeit dar. Allerdings war dies keine leichte Aufgabe. Dieser Teil war sehr langwierig und beanspruchte sehr viel Zeit. Der Grund dafür ist, dass aus bisher veröffentlichten Arbeiten keine Anleitung für diesen Assay gewonnen werden konnte, da sich die meisten Forschungsarbeiten im Bereich von Nervenfasern mit den an der Schmerzweiterleitung verantwortlichen sensiblen Nervenfasern beschäftigen, nicht jedoch mit den sympathischen Nervenfasern [187]. Wenn sympathische Nervenfasern untersucht wurden, wurden meist nur einzelne Neuronen untersucht, die aber nur schlecht sichtbar sind und für unsere Zwecke nicht geeignet waren [228; 229]. Anfangs stellte sich heraus, dass die sympathischen Grenzstrangganglien von 3 Wochen-alten Mäusen sehr gut in Matrigel auswachsen. Matrigel ist eine gelöste Basalmembranzubereitung, die aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Maus-Sarkom extrahiert wurde. Dieser Tumor ist reich an extrazellulären Matrixproteinen. Die Hauptbestandteile sind Laminin, Collagen IV, Entactin und Heparansulfat-Proteoglykan. In EHS-Tumoren natürlich vorkommende Wachstumsfaktoren sind ebenfalls enthalten. Das Matrigel polymerisiert bei Raumtemperatur und erzeugt biologisch aktives Matrixmaterial, das der zellulären Basalmembranmatrix von Säugetieren ähnelt. Das Problem des Matrigels war allerdings, dass applizierte Substanzen nur sehr schlecht und unkontrolliert durch das Matrigel diffundierten. Außerdem enthält das Gel zahlreiche undefinierte Faktoren, die auf das Verhalten von Nervenfasern in unkontrollierter und nicht vorhersagbarer Weise Einfluss nehmen könnten. Daher war die Entwicklung eines neuen experimentellen Ansatzes nötig, bei dem auf das Matrigel verzichtet werden konnte. Allerdings mussten hierfür

neugeborene Mäuse mit einem Alter von 2-4 Tagen verwendet werden. Hier zeigten sich Poly-D-Lysin-beschichtete *culture slides* als sehr vielversprechend. Im Vergleich zu Kollagen-beschichteten oder Fibronectin-beschichteten *culture slides* wurden mit Poly-D-Lysin-beschichteten *culture slides* die höchsten Auswachsarten erzielt. Allerdings sind nur ca. 20-25 % der Ganglien ausgewachsen, von denen wiederum nur 25 % soweit ausgewachsen waren, dass sie für die weiteren Versuche herangezogen werden konnten. Die Auswachsrate konnte auch durch die Zugabe von versch. anderen Faktoren wie *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) und Ascorbinsäure nicht verbessert werden. Die Gründe für die geringe Auswachsrate sind nicht bekannt.

## **5.4 Bedeutung von Semaphorin 3C und Semaphorin 3F und ihres Rezeptors NPN-2 für die Entzündungsreaktion**

Ein Verlust von sympathischen Nervenfasern ist bereits kurz nach Ausbruch der symptomatischen Entzündung zu beobachten [230; 231]. Dieser Verlust von sympathischen Nervenfasern könnte ein generelles Phänomen bei Entzündungsprozessen sein, da er sowohl im entzündeten Synovialgewebe von RA-Patienten [105] und Mäusen mit CIA [232], als auch in entzündeten Mausmilzen nach einer Enterotoxin B-Injektion von Staphylokokken [233] und in der Darmmucosa eines Kolitis-Mausmodells [234] festgestellt werden konnte. Dieser Vorgang könnte ein aktiver und beabsichtigter Prozess der Entzündung sein, welcher wahrscheinlich durch Nervenrepulsionsfaktoren vermittelt wird. Es scheint, dass hierbei die sympathischen Nervenfasern mit ihren anti-inflammatoryischen und anti-proliferativen Eigenschaften im Entzündungsgebiet nicht erwünscht sind. Dieser Prozess scheint ein evolutionär konservierter Prozess zu sein, der für eine akute Entzündungsreaktion gedacht war und für eine bessere und schnellere Wundheilung sorgen soll. Durch den Verlust von sympathischen Nervenfasern ist die Konzentration an anti-inflammatoryischen Neurotransmittern in der entzündeten Gelenkregion niedrig, und dies führt dann zu einer Verstärkung der pro-inflammatoryischen Situation. In niedrigen Konzentrationen nämlich binden die Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems (SNS) an  $\alpha$ -Adrenorezeptoren, die die Sekretion von TNF durch Makrophagen vermitteln [235]. Gleichzeitig induziert

Substanz P von sensiblen Nervenfasern die Ausschüttung versch. Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF) und die Chemotaxis versch. Zelltypen [92; 236; 237].

Parallel zum Rückzug sympathischer Nervenfasern aus dem Entzündungsgebiet findet man ein Einsprossen sensibler Nervenfasern [238; 239]. Das Einsprossen sensibler Nervenfasern stellt ein inflammatorisches/proliferatives Signal dar [240; 242] und ist direkt mit der arteriellen Neovaskularisation vergesellschaftet [243]. Das Übergewicht des sensiblen Nervensystems gegenüber dem SNS trägt zu einer rascheren Wundheilung bei, da das SNS einen ungünstigen Einfluß auf die Wundheilung ausübt [244; 245]. Im chronischen autoimmunen Entzündungsprozess jedoch hat dieser Mechanismus überhaupt keinen Sinn mehr. Im Gegenteil, er hat sogar nachteilige Effekte.

Die beiden Semaphorine 3C und -3F sind die beiden Mitglieder der Semaphorin-Familie, die hauptsächlich einen Rückzug sympathischer Nervenfasern bewirken können [246; 247]. Wie bereits gezeigt werden konnte, ist die Anzahl Semaphorin 3C-positiver Zellen im Synovialgewebe von RA-Patienten im Vergleich zu OA-Patienten und Trauma-Patienten ohne Entzündungen signifikant erhöht [217]. Ein weiterer Hinweis ist auch, dass beim Charcot-Fuß von Diabetes-Patienten viele Semaphorin 3C-positive Zellen nachgewiesen werden konnten. Die negative Wechselbeziehung zwischen der Dichte von sympathischen Nervenfasern und der Dichte von Semaphorin 3C-positiven Zellen deutet daraufhin, dass die Semaphorine ein wichtiges Element in der Repulsion sympathischer Nervenfasern darstellen.

Bei der immunhistochemischen Bestimmung der Dichte von Semaphorin 3F-positiven Zellen im Synovialgewebe konnte im Gegensatz zu Semaphorin 3C-positiven Zellen kein Unterschied zwischen RA- und OA-Patienten festgestellt werden. Dieser Befund und eine gleichzeitig beobachtete Verschlechterung des Arthritis-Schweregrades durch appliziertes NPN-2fc deuteten auf eine entscheidende Schlüsselfunktion des löslichen NPN-2 im Arthritisgeschehen hin. Die Messungen der Konzentrationen an löslichem NPN-2 in den Körperflüssigkeiten (Plasma, Superfusat und Synovialflüssigkeit) von RA- und OA-Patienten zeigten, dass die NPN-2 Konzentrationen bei den RA-Patienten im Vergleich zu OA-Patienten erhöht waren. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass das lösliche NPN-2 vermutlich nicht wie ursprünglich erwartet einen neutralisierenden Effekt auf das Semaphorin 3F ausübt,

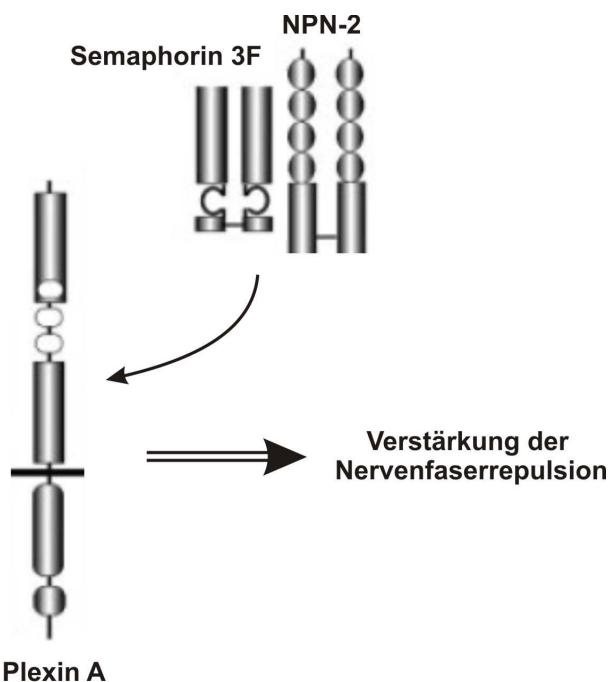
sondern eine fördernde Wirkung auf den durch Semaphorin 3F bedingten Rückzug von sympathischen Nervenfasern hat.

Diese Hypothese konnte in dem dafür entwickelten Neuriten-Auswachs-Assay überprüft werden. In diesen Versuchen zeigte sich, dass Semaphorin 3F zwei unterschiedliche Arten der Nervenfaserrepulsion in den sympathischen Nervenfasern auslöst. Eine Art resultiert in einem fast kompletten Rückzug der Nervenfasern, während die andere Art eine Repulsion zeigt, bei der viele abgeschnürte vesikuläre Fragmente unterschiedlicher Größe (Trümmerfeld) zurückgelassen werden. Wann sich oder weshalb sich die eine oder andere Art des Nervenfaserrückzugs ereignet, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Ob beide Arten ebenfalls *in vivo* zu beobachten sind, oder sie nur *in vitro* stattfinden, wurde ebenfalls noch nicht untersucht. Allerdings ähneln die Fragmente den sogenannten Synaptosomen (Abschnürungen von synaptischen Vesikeln), die bereits in den 60iger Jahren beschrieben wurden [218]. Eine Erklärung für den Trümmerfeldrückzug könnte sein, dass auf diese Weise noch relativ hohe Konzentrationen an sympathischen Neurotransmittern für eine kurze Zeit aufrechterhalten werden, welche das Neuron vor schädlichen Einflüssen schützen.

Mit Hilfe des Neuriten-Auswachs-Assays konnte gezeigt werden, dass Semaphorin 3F bei einer Konzentration von 160-210 nmol/l den Rückzug von sympathischen Nervenfasern zu 50% induzierte. Dieser Wert liegt etwas oberhalb der mittels Oberflächenplasmonresonanz ermittelten Bindungskonstante von 96 nmol/l. Dies ist wahrscheinlich auf die vorausgegangene Einwirkung von NGF zurückzuführen, welches für das Auswachsen der Ganglien eingesetzt wurde. Das wachstumsfördernde NGF vermindert vermutlich den repulsiven Effekt des Semaphorin 3F.

Die gleichzeitige Gabe von Semaphorin 3F und NPN-2fc beeinflusste wie erwartet das Auswachsen der Nervenfasern nicht. Die zusätzliche Gabe von NPN-2fc verstärkte aber entgegen den ursprünglichen Annahmen den Rückzug der Nervenfasern. Mit diesem Resultat wurde das überraschende Ergebnis des CIA-Tierversuchs und die erhöhten Konzentrationen an löslichem NPN-2 bei RA-Patienten bei ähnlichen Verhältnissen hinsichtlich des Repulsionsfaktors Semaphorin 3F bei RA- und OA-Patienten erklärbar. Die Gabe von löslichem NPN-2 verstärkt den Rückzug von sympathischen Nervenfasern, was zu einer Verstärkung der

Entzündung führt und damit mit einer Verschlimmerung der Arthritis einhergeht. Die Erklärung für dieses Phänomen könnte darin begründet liegen, dass das NPN-2 zwar das Semaphorin 3F bindet, damit jedoch keine Inhibition der Signalkaskade auslöst (Abb. 5.1). Der mögliche Mechanismus für diesen beobachteten Effekt ist wahrscheinlich die Bildung eines Dimerkomplexes, bestehend aus Semaphorin und löslichem NPN-2. Dieser Komplex hat noch die Fähigkeit an Plexin auf der Oberfläche der sympathischen Nervenendigungen zu binden (Abb. 5.1).



**Abb. 5.1: Möglicher Mechanismus, der für die Erhöhung der Nervenfaserrepulsion verantwortlich sein könnte**

Lösliches NPN-2 bildet zusammen mit Semaphorin 3F einen Dimerkomplex. Dieser Dimerkomplex bindet mit erhöhter Affinität an den Plexin A-Rezeptor. Der Plexin A-Rezeptor ist für die Signalweiterleitung ins Zellinnere verantwortlich.

Auf diese Weise wird vermutlich die Weiterleitung der Signalkaskade von Plexin in das Innere der Nervenfaser verstärkt, was zu dem erhöhten Nervenfaserrückzug führt.

## 6 Zusammenfassung

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, einen möglichen neuen Therapieansatz in der Behandlung der RA zu entwickeln. Dem beobachteten Verlust von sympathischen Nervenfasern aus dem Entzündungsgebiet bei RA und anderen Entzündungskrankheiten sollte entgegengewirkt werden, da die Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems (SNS) in hohen Konzentrationen anti-inflammatorisch wirken und somit deren Verlust einen Chronifizierungsfaktor der Entzündung darstellen könnte. Für den Verlust der Nervenfasern konnten Repulsionsfaktoren aus der Familie der Semaphorine verantwortlich gemacht werden. Da mehrere Mitglieder aus der Familie der Semaphorine an den verantwortlichen promiskuen Rezeptor NPN-2 auf den sympathischen Nervenendigungen binden, war die Möglichkeit der Neutralisierung eines einzelnen Repulsionsfaktors nicht möglich. Mit dem Einsatz eines löslichen Neuropilin-2 Fc-Fusionskonstrukts (NPN-2fc) sollten die Repulsionsfaktoren abgefangen werden, um deren Bindung an den NPN-2-Rezeptor auf den sympathischen Nervenendigungen zu verhindern. Die Bedeutung der Blockade dieses Rezeptors wurde für das Krankheitsgeschehen der Arthritis untersucht. Für die Untersuchung von sympathischen Nervenfasern *in vitro* konnte ein Neuriten-Auswachs-Assay entwickelt werden, mit dem die Wirkung von Semaphorin 3F getestet werden konnte. Es bestätigte sich, dass Semaphorin 3F für die Repulsion sympathischer Nervenfasern verantwortlich ist. Allerdings zeigte sich, dass die ursprüngliche Idee, die Semaphorine mit einem NPN-2 Fc-Fusionskonstrukt zu neutralisieren, in der Praxis nicht möglich ist. Unerwarteterweise verstärkte das Konstrukt die Nervenfaserrepulsion von sympathischen Nervenfasern *in vitro* und die Krankheitsausprägung der experimentellen Arthritis *in vivo*. Außerdem befanden sich in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit RA höhere Konzentrationen des löslichen NPN-2 im Vergleich zu Patienten mit Osteoarrose (OA).

Trotz dieses unerhofften Ergebnisses kann man aber trotzdem von einem Erfolg sprechen. Der gewonnene Erkenntnisgewinn über das NPN-2 könnte zu möglichen neuen Therapiestrategien führen. So könnte eine Hemmung des NPN-2-shedding zu einer Verbesserung im Krankheitsverlauf der Arthritis beitragen. Weiterhin bestünde die Möglichkeit, das bisher eingesetzte Konstrukt durch ein anderes Konstrukt, welches aus einem NPN-2 und einem Plexin besteht, zu ersetzen. Durch

die gleichzeitige Hemmung des NPN-2 und des Plexins könnte vermutlich der erhoffte neutralisierende Effekt erzielt werden. Der Effekt dieses Konstrukts wäre dann wieder im Neuriten-Wachstumsassay *in vitro* und in der Kollagen Typ II – induzierten Arthritis *in vivo* zu testen. Weiterhin stellt der etablierte Neuriten-Wachstumsassay die Möglichkeit dar, die Wirkung versch. anderer Substanzen auf das Verhalten der Nervenfasern zu testen. Auf diese Weise wäre die Identifikation von zusätzlichen Faktoren denkbar, die für den Rückzug der sympathischen Nervenfasern verantwortlich sind.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Zell R.A. and Unrath C. *Rheuma*. Bundesministerium für Bildung und Forschung; 2001.
2. Gabriel, S. E., Crowson, C. S., and O'Fallon, W. M. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955-1985. *Arthritis Rheum*. 1999; 42:415-420.
3. Pincus, T. and Callahan, L. F. What is the natural history of rheumatoid arthritis? *Rheum.Dis.Clin.North Am*. 1993; 19:123-151.
4. Goodson, N. and Symmons, D. Rheumatoid arthritis in women: still associated with an increased mortality. *Ann.Rheum.Dis.* 2002; 61:955-956.
5. Reginster, J. Y. The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology.(Oxford)*. 2002; 41 (Suppl) 1:3-6.
6. Pincus, T., Kavanaugh, A., and Sokka, T. Benefit/risk of therapies for rheumatoid arthritis: underestimation of the "side effects" or risks of RA leads to underestimation of the benefit/risk of therapies. *Clin.Exp.Rheumatol*. 2004; 22:S2-11.
7. Langer, H. E. [Biologics in the early treatment of ankylosing spondylitis and related forms of spondyloarthritis]. *Wien.Med.Wochenschr*. 2008; 158:200-205.
8. Kobelt, G., Woronoff, A. S., Richard, B., Peeters, P., and Sany, J. Disease status, costs and quality of life of patients with rheumatoid arthritis in France: the ECO-PR Study. *Joint Bone Spine*. 2008; 75:408-415.
9. Klareskog, L., Stolt, P., Lundberg, K., Kallberg, H., Bengtsson, C., Grunewald, J., Ronnelid, J., Harris, H. E., Ulfgren, A. K., Rantapaa-Dahlqvist, S., Eklund, A., Padyukov, L., and Alfredsson, L. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*. 2006; 54:38-46.
10. Pedersen, M., Jacobsen, S., Garred, P., Madsen, H. O., Klarlund, M., Svejgaard, A., Pedersen, B. V., Wohlfahrt, J., and Frisch, M. Strong combined gene-environment effects in anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis: a nationwide case-control study in Denmark. *Arthritis Rheum*. 2007; 56:1446-1453.
11. Feldmann, M., Brennan, F. M., and Maini, R. N. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996; 85:307-310.
12. Holmdahl, R., Andersson, M., Goldschmidt, T. J., Gustafsson, K., Jansson, L., and Mo, J. A. Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. *Immunol.Rev*. 1990; 118:193-232.
13. Schaller, M., Burton, D. R., and Ditzel, H. J. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nat.Immunol*. 2001; 2:746-753.
14. Knedla, A., Neumann, E., and Muller-Ladner, U. Developments in the synovial biology field 2006. *Arthritis Res.Ther*. 2007; 9:209.

15. Goldring, S. R. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology(Oxford)* 2003; 42 Suppl 2:ii11-ii16.
16. Pap, T., Muller-Ladner, U., Gay, R. E., and Gay, S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000; 2:361-367.
17. Mulherin, D., Fitzgerald, O., and Bresnihan, B. Clinical improvement and radiological deterioration in rheumatoid arthritis: evidence that the pathogenesis of synovial inflammation and articular erosion may differ. *Br.J.Rheumatol.* 1996; 35:1263-1268.
18. Cunnane, G., Fitzgerald, O., Hummel, K. M., Gay, R. E., Gay, S., and Bresnihan, B. Collagenase, cathepsin B and cathepsin L gene expression in the synovial membrane of patients with early inflammatory arthritis. *Rheumatology(Oxford)* 1999; 38:34-42.
19. Buckley, C. D., Pilling, D., Lord, J. M., Akbar, A. N., Scheel-Toellner, D., and Salmon, M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol.* 2001; 22:199-204.
20. Antoni, C. E. and Manger, B. [Biologicals: a new therapeutic approach for inflammatory diseases]. *Internist (Berl).* 2004; 45 (Suppl 1):S31-S37.
21. Firestein, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423:356-361.
22. Oliver, J. E. and Silman, A. J. Risk factors for the development of rheumatoid arthritis. *Scand.J.Rheumatol.* 2006; 35:169-174.
23. Stastny, P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J.Clin.Invest.* 1976; 57:1148-1157.
24. Gregersen, P. K., Silver, J., and Winchester, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987; 30:1205-1213.
25. Deighton, C. M., Walker, D. J., Griffiths, I. D., and Roberts, D. F. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin.Genet.* 1989; 36:178-182.
26. Wordsworth, B. P. HLA class II antigens in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Br.J.Rheumatol.* 1991; 30:151-152.
27. Ling, S., Lai, A., Borschukova, O., Pumpens, P., and Holoshitz, J. Activation of nitric oxide signaling by the rheumatoid arthritis shared epitope. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:3423-3432.
28. Gorman, J. D., Lum, R. F., Chen, J. J., Suarez-Almazor, M. E., Thomson, G., and Criswell, L. A. Impact of shared epitope genotype and ethnicity on erosive disease: a meta-analysis of 3,240 rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:400-412.
29. McDaniel, D. O., Alarcon, G. S., Pratt, P. W., and Reveille, J. D. Most African-American patients with rheumatoid arthritis do not have the rheumatoid antigenic determinant (epitope). *Ann.Intern.Med.* 1995; 123:181-187.
30. Raychaudhuri, S., Remmers, E. F., Lee, A. T., Hackett, R., Guiducci, C., Burtt, N. P., Gianniny, L., Korman, B. D., Padyukov, L., Kurreeman, F. A., Chang, M., Catanese, J. J., Ding, B., Wong, S., van der Helm-van Mil AH, Neale, B. M., Coblyn, J., Cui, J.,

- Tak, P. P., Wolbink, G. J., Crusius, J. B., van der Horst-Bruinsma IE, Criswell, L. A., Amos, C. I., Seldin, M. F., Kastner, D. L., Ardlie, K. G., Alfredsson, L., Costenbader, K. H., Altshuler, D., Huizinga, T. W., Shadick, N. A., Weinblatt, M. E., de, Vries N., Worthington, J., Seielstad, M., Toes, R. E., Karlson, E. W., Begovich, A. B., Klareskog, L., Gregersen, P. K., Daly, M. J., and Plenge, R. M. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat.Genet.* 2008; 40:1216-1223.
31. Begovich, A. B., Carlton, V. E., Honigberg, L. A., Schrodi, S. J., Chokkalingam, A. P., Alexander, H. C., Ardlie, K. G., Huang, Q., Smith, A. M., Spoerke, J. M., Conn, M. T., Chang, M., Chang, S. Y., Saiki, R. K., Catanese, J. J., Leong, D. U., Garcia, V. E., McAllister, L. B., Jeffery, D. A., Lee, A. T., Batliwalla, F., Remmers, E., Criswell, L. A., Seldin, M. F., Kastner, D. L., Amos, C. I., Sninsky, J. J., and Gregersen, P. K. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am.J.Hum.Genet.* 2004; 75:330-337.
32. Plenge, R. M. Recent progress in rheumatoid arthritis genetics: one step towards improved patient care. *Curr.Opin.Rheumatol.* 2009; 21:262-271.
33. Holliday, R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* 2006; 1:76-80.
34. Strietholt, S., Maurer, B., Peters, M. A., Pap, T., and Gay, S. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.Ther.* 2008; 10:219.
35. Berezikov, E. and Plasterk, R. H. Camels and zebrafish, viruses and cancer: a microRNA update. *Hum.Mol.Genet.* 2005; 14 Spec No. 2:R183-R190.
36. Berezikov, E., Guryev, V., van de Belt, J., Wienholds, E., Plasterk, R. H., and Cuppen, E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 2005; 120:21-24.
37. Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., and Burge, C. B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115:787-798.
38. Li, Q. J., Chau, J., Ebert, P. J., Sylvester, G., Min, H., Liu, G., Braich, R., Manoharan, M., Soutschek, J., Skare, P., Klein, L. O., Davis, M. M., and Chen, C. Z. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 2007; 129:147-161.
39. Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M. V., Couttet, P., Soond, D. R., van, Dongen S., Grocock, R. J., Das, P. P., Miska, E. A., Vetrie, D., Okkenhaug, K., Enright, A. J., Dougan, G., Turner, M., and Bradley, A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 2007; 316:608-611.
40. Thai, T. H., Calado, D. P., Casola, S., Ansel, K. M., Xiao, C., Xue, Y., Murphy, A., Frendewey, D., Valenzuela, D., Kutok, J. L., Schmidt-Suprian, M., Rajewsky, N., Yancopoulos, G., Rao, A., and Rajewsky, K. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 2007; 316:604-608.
41. Andersson, A. K., Li, C., and Brennan, F. M. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.Ther.* 2008; 10:204.
42. Sedivy, J. M., Banumathy, G., and Adams, P. D. Aging by epigenetics--a consequence of chromatin damage? *Exp.Cell Res.* 2008; 314:1909-1917.

43. Criswell, L. A., Lum, R. F., Turner, K. N., Woehl, B., Zhu, Y., Wang, J., Tiwari, H. K., Edberg, J. C., Kimberly, R. P., Moreland, L. W., Seldin, M. F., and Bridges, S. L., Jr. The influence of genetic variation in the HLA-DRB1 and LTA-TNF regions on the response to treatment of early rheumatoid arthritis with methotrexate or etanercept. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:2750-2756.
44. Kaminsky, Z., Petronis, A., Wang, S. C., Levine, B., Ghaffar, O., Floden, D., and Feinstein, A. Epigenetics of personality traits: an illustrative study of identical twins discordant for risk-taking behavior. *Twin.Res.Hum.Genet.* 2008; 11:1-11.
45. Mewar, D. and Wilson, A. G. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomed.Pharmacother.* 2006; 60:648-655.
46. Schellekens, H. How to predict and prevent the immunogenicity of therapeutic proteins. *Biotechnol.Annu.Rev.* 2008; 14:191-202.
47. Berglin, E., Padyukov, L., Sundin, U., Hallmans, G., Stenlund, H., Van Venrooij, W. J., Klareskog, L., and Dahlqvist, S. R. A combination of autoantibodies to cyclic citrullinated peptide (CCP) and HLA-DRB1 locus antigens is strongly associated with future onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.Ther.* 2004; 6:R303-R308.
48. Johansson, M., Arlestig, L., Hallmans, G., and Rantapaa-Dahlqvist, S. PTPN22 polymorphism and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in combination strongly predicts future onset of rheumatoid arthritis and has a specificity of 100% for the disease. *Arthritis Res.Ther.* 2006; 8:R19.
49. Kruger, K. [Medical treatment of rheumatoid arthritis]. *Schmerz* 2000; 14:193-206.
50. E.Märker-Hermann, W.-J.Mayet, and A.Schwarting. *Rheumatologie/Immunologie. Innere Medizin.* 2006.
51. Daniela Loisl and Rudolf Puchner. *Medikamentöse Therapie rheumatischer Erkrankungen. Diagnose Rheuma* 2006.
52. Mertens, M. and Singh, J. A. Anakinra for rheumatoid arthritis. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* 2009; CD005121.
53. Furst, D. E. Rational disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD) therapy: is it possible? *Br.J.Rheumatol.* 1996; 35:707-708.
54. Rau, R. Treatment of chronic polyarthritis with methotrexate 1994--a review. *Z.Rheumatol.* 1994; 53:199-229.
55. Schett, G., Stach, C., Zwerina, J., Voll, R., and Manger, B. How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58:2936-2948.
56. Weinblatt, M. E., Kaplan, H., Germain, B. F., Block, S., Solomon, S. D., Merriman, R. C., Wolfe, F., Wall, B., Anderson, L., Gall, E., and . Methotrexate in rheumatoid arthritis. A five-year prospective multicenter study. *Arthritis Rheum.* 1994; 37:1492-1498.
57. Bingham, C. O., III. Emerging therapeutics for rheumatoid arthritis. *Bull.NYU.Hosp.Jt.Dis.* 2008; 66:210-215.
58. Franklin, C. M. Clinical experience with soluble TNF p75 receptor in rheumatoid arthritis. *Semin.Arthritis Rheum.* 1999; 29:172-181.

59. Harriman, G., Harper, L. K., and Schaible, T. F. Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment. *Ann.Rheum.Dis.* 1999; 58 (Suppl 1):I61-I64.
60. Kalden, J. R. and Manger, B. Biologic agents in the treatment of inflammatory rheumatic diseases. *Curr.Opin.Rheumatol.* 1998; 10:174-178.
61. van Vollenhoven, R. F. Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. *Nat.Rev.Rheumatol.* 2009; 5:531-541.
62. Kokkalis, Z. T., Schmidt, C. C., and Sotereanos, D. G. Elbow arthritis: current concepts. *J.Hand Surg.Am.* 2009; 34:761-768.
63. Schattenkirchner, M. Rheumatology--past, present, and future. *Eur.J.Rheumatol.Inflamm.* 1987; 8:31-37.
64. Hegen, M., Keith, J. C., Jr., Collins, M., and Nickerson-Nutter, C. L. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 2008; 67:1505-1515.
65. Kouskoff, V., Korganow, A. S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., and Mathis, D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 1996; 87:811-822.
66. Kyburz, D. and Corr, M. The KRN mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin.Immunopathol.* 2003; 25:79-90.
67. Hang, L., Theofilopoulos, A. N., and Dixon, F. J. A spontaneous rheumatoid arthritis-like disease in MRL/l mice. *J.Exp.Med.* 1982; 155:1690-1701.
68. Hom, J. T., Cole, H., and Bendele, A. M. Interleukin 1 enhances the development of spontaneous arthritis in MRL/lpr mice. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1990; 55:109-119.
69. Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., and Kollias, G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 1991; 10:4025-4031.
70. Li, P. and Schwarz, E. M. The TNF-alpha transgenic mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin.Immunopathol.* 2003; 25:19-33.
71. Cromartie, W. J., Craddock, J. G., Schwab, J. H., Anderle, S. K., and Yang, C. H. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J.Exp.Med.* 1977; 146:1585-1602.
72. Esser, R. E., Stimpson, S. A., Cromartie, W. J., and Schwab, J. H. Reactivation of streptococcal cell wall-induced arthritis by homologous and heterologous cell wall polymers. *Arthritis Rheum.* 1985; 28:1402-1411.
73. PEARSON, C. M. Development of arthritis, periarthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1956; 91:95-101.
74. Nandakumar, K. S. and Holmdahl, R. Efficient promotion of collagen antibody induced arthritis (CAIA) using four monoclonal antibodies specific for the major epitopes recognized in both collagen induced arthritis and rheumatoid arthritis. *J.Immunol.Methods.* 2005; 304:126-136.

75. Holmdahl, R., Andersson, M. E., Goldschmidt, T. J., Jansson, L., Karlsson, M., Malmstrom, V., and Mo, J. Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis. *Immunogenetics, pathogenesis and autoimmunity*. APMIS. 1989; 97:575-584.
76. Courtenay, J. S., Dallman, M. J., Dayan, A. D., Martin, A., and Mosedale, B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 1980; 283:666-668.
77. Wooley, P. H., Luthra, H. S., Stuart, J. M., and David, C. S. Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. *J.Exp.Med.* 1981; 154:688-700.
78. Seki, N., Sudo, Y., Yoshioka, T., Sugihara, S., Fujitsu, T., Sakuma, S., Ogawa, T., Hamaoka, T., Senoh, H., and Fujiwara, H. Type II collagen-induced murine arthritis. I. Induction and perpetuation of arthritis require synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J.Immunol.* 1988; 140:1477-1484.
79. Svensson, L., Jirholt, J., Holmdahl, R., and Jansson, L. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin.Exp.Immunol.* 1998; 111:521-526.
80. Holmdahl, R., Klareskog, L., Rubin, K., Larsson, E., and Wigzell, H. T lymphocytes in collagen II-induced arthritis in mice. Characterization of arthritogenic collagen II-specific T-cell lines and clones. *Scand.J.Immunol.* 1985; 22:295-306.
81. Trentham, D. E., Dynesius, R. A., and David, J. R. Passive transfer by cells of type II collagen-induced arthritis in rats. *J.Clin.Invest.* 1978; 62:359-366.
82. Englert, M. E., Ferguson, K. M., Suarez, C. R., Oronsky, A. L., and Kerwar, S. S. Passive transfer of collagen arthritis: heterogeneity of anti-collagen IgG. *Cell Immunol.* 1986; 101:373-379.
83. Holmdahl, R., Jansson, L., Larsson, A., and Jonsson, R. Arthritis in DBA/1 mice induced with passively transferred type II collagen immune serum. *Immunohistopathology and serum levels of anti-type II collagen auto-antibodies*. *Scand.J.Immunol.* 1990; 31:147-157.
84. Hietala, M. A., Jonsson, I. M., Tarkowski, A., Kleinau, S., and Pekna, M. Complement deficiency ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *J.Immunol.* 2002; 169:454-459.
85. Wang, Y., Kristan, J., Hao, L., Lenkoski, C. S., Shen, Y., and Matis, L. A. A role for complement in antibody-mediated inflammation: C5-deficient DBA/1 mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J.Immunol.* 2000; 164:4340-4347.
86. Okamoto, Y., Gotoh, Y., Tokui, H., Mizuno, A., Kobayashi, Y., and Nishida, M. Characterization of the cytokine network at a single cell level in mice with collagen-induced arthritis using a dual color ELISPOT assay. *J.Interferon Cytokine Res.* 2000; 20:55-61.
87. Brand, D. D., Kang, A. H., and Rosloniec, E. F. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin.Immunopathol.* 2003; 25:3-18.
88. Morgan, K., Clague, R. B., Shaw, M. J., Firth, S. A., Twose, T. M., and Holt, P. J. Native type II collagen--induced arthritis in the rat: the effect of complement depletion by cobra venom factor. *Arthritis Rheum.* 1981; 24:1356-1362.

89. Bendele, A., McComb, J., Gould, T., McAbee, T., Sennello, G., Chlipala, E., and Guy, M. Animal models of arthritis: relevance to human disease. *Toxicol.Pathol.* 1999; 27:134-142.
90. Williams, R. O. Rodent models of arthritis: relevance for human disease. *Clin.Exp.Immunol.* 1998; 114:330-332.
91. Bendele, A. M. Animal models of osteoarthritis. *J.Musculoskelet.Neural.Interact.* 2001; 1:363-376.
92. Luross, J. A. and Williams, N. A. The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis. *Immunology* 2001; 103:407-416.
93. Tada, T. The immune system as a supersystem. *Annu.Rev.Immunol.* 1997; 15:1-13.
94. Blalock, J. E. and Smith, E. M. Conceptual development of the immune system as a sixth sense. *Brain Behav.Immun.* 2007; 21:23-33.
95. Varela, F. J. and Coutinho, A. Second generation immune networks. *Immunol.Today.* 1991; 12:159-166.
96. Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P., and Vizi, E. S. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol.Rev.* 2000; 52:595-638.
97. Park, H. T., Wu, J., and Rao, Y. Molecular control of neuronal migration. *Bioessays.* 2002; 24:821-827.
98. Faller A. and Schünke M. *Der Körper des Menschen.* Georg Thieme Verlag; 1999.
99. Madden, K. S., Sanders, V. M., and Felten, D. L. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 1995; 35:417-448.
100. McCracken T.O. *Der 3D Anatomie Atlas.* Bechtermünz; 1999.
101. Lundberg, J. M., Rudehill, A., Sollevi, A., and Hamberger, B. Evidence for co-transmitter role of neuropeptide Y in the pig spleen. *Br.J.Pharmacol.* 1989; 96:675-687.
102. Haug, S. R. and Heyeraas, K. J. Modulation of dental inflammation by the sympathetic nervous system. *J.Dent.Res.* 2006; 85:488-495.
103. Straub R.H., Besedovsky H., and del Rey A. Allgemeine Konzepte der Psychoneuroendokrino-Immunologie. *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen.* Vandenhoeck&Ruprecht; 2007. 11-34.
104. Zukowska-Grojec, Z., Karwatowska-Prokopcuk, E., Fisher, T. A., and Ji, H. Mechanisms of vascular growth-promoting effects of neuropeptide Y: role of its inducible receptors. *Regul.Pept.* 1998; 75-76:231-238.
105. Miller, L. E., Justen, H. P., Scholmerich, J., and Straub, R. H. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J.* 2000; 14:2097-2107.

106. Tatsumoto, K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1982; 79:5485-5489.
107. Ekblad, E., Edvinsson, L., Wahlestedt, C., Uddman, R., Hakanson, R., and Sundler, F. Neuropeptide Y co-exists and co-operates with noradrenaline in perivascular nerve fibers. *Regul.Pept.* 1984; 8:225-235.
108. Grant, K. R., Harnett, W., Milligan, G., and Harnett, M. M. Differential G-protein expression during B- and T-cell development. *Immunology* 1997; 90:564-571.
109. Wu, D., Kuang, Y., Wu, Y., and Jiang, H. Selective coupling of beta 2-adrenergic receptor to hematopoietic-specific G proteins. *J.Biol.Chem.* 1995; 270:16008-16010.
110. Abbas, A. K., Murphy, K. M., and Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383:787-793.
111. Mosmann, T. R. and Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol.Today*. 1996; 17:138-146.
112. Wilder, R. L. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annu.Rev.Immunol.* 1995; 13:307-338.
113. Felten, S. Y., Felten, D. L., Bellinger, D. L., Carlson, S. L., Ackerman, K. D., Madden, K. S., Olschowka, J. A., and Livnat, S. Noradrenergic sympathetic innervation of lymphoid organs. *Prog.Allergy*. 1988; 43:14-36.
114. Abrass, C. K., O'Connor, S. W., Scarpace, P. J., and Abrass, I. B. Characterization of the beta-adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. *J.Immunol.* 1985; 135:1338-1341.
115. Hadden, J. W., Hadden, E. M., and Middleton E Jr. Lymphocyte blast transformation. I. Demonstration of adrenergic receptors in human peripheral lymphocytes. *Cell Immunol.* 1970; 1:583-595.
116. Togari, A. Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. *Microsc.Res.Tech.* 2002; 58:77-84.
117. Fearon, D. T. and Locksley, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272:50-53.
118. Woiciechowsky, C., Asadullah, K., Nestler, D., Eberhardt, B., Platzer, C., Schoning, B., Glockner, F., Lanksch, W. R., Volk, H. D., and Docke, W. D. Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat.Med.* 1998; 4:808-813.
119. Hasko, G., Nemeth, Z. H., Szabo, C., Zsilla, G., Salzman, A. L., and Vizi, E. S. Isoproterenol inhibits IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Brain Res.Bull.* 1998; 45:183-187.
120. van der Poll, T., Coyle, S. M., Barbosa, K., Braxton, C. C., and Lowry, S. F. Epinephrine inhibits tumor necrosis factor-alpha and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *J.Clin.Invest.* 1996; 97:713-719.

121. Maisel, A. S., Fowler, P., Rearden, A., Motulsky, H. J., and Michel, M. C. A new method for isolation of human lymphocyte subsets reveals differential regulation of beta-adrenergic receptors by terbutaline treatment. *Clin.Pharmacol.Ther.* 1989; 46:429-439.
122. Sanders, V. M. The role of adrenoceptor-mediated signals in the modulation of lymphocyte function. *Adv.Neuroimmunol.* 1995; 5:283-298.
123. Spengler, R. N., Allen, R. M., Remick, D. G., Strieter, R. M., and Kunkel, S. L. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. *J.Immunol.* 1990; 145:1430-1434.
124. Harle, P., Mobius, D., Carr, D. J., Scholmerich, J., and Straub, R. H. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:1305-1313.
125. Le, Moine O., Stordeur, P., Schandene, L., Marchant, A., de, Groote D., Goldman, M., and Deviere, J. Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. *J.Immunol.* 1996; 156:4408-4414.
126. Renz, H., Gong, J. H., Schmidt, A., Nain, M., and Gems, D. Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. *J.Immunol.* 1988; 141:2388-2393.
127. Weiss, M., Schneider, E. M., Liebert, S., Mettler, S., and Lemoine, H. Vasoactive drugs inhibit oxygen radical production of neutrophils. *Immunopharmacol.Immunotoxicol.* 1997; 19:239-263.
128. Schedlowski, M., Falk, A., Rohne, A., Wagner, T. O., Jacobs, R., Tewes, U., and Schmidt, R. E. Catecholamines induce alterations of distribution and activity of human natural killer (NK) cells. *J.Clin.Immunol.* 1993; 13:344-351.
129. Baerwald, C. G., Laufenberg, M., Specht, T., von, Wichert P., Burmester, G. R., and Krause, A. Impaired sympathetic influence on the immune response in patients with rheumatoid arthritis due to lymphocyte subset-specific modulation of beta 2-adrenergic receptors. *Br.J.Rheumatol.* 1997; 36:1262-1269.
130. Straub, R. H. and Cutolo, M. Involvement of the hypothalamic--pituitary--adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role. *Arthritis Rheum.* 2001; 44:493-507.
- 131.Coderre, T. J. and Melzack, R. Central neural mediators of secondary hyperalgesia following heat injury in rats: neuropeptides and excitatory amino acids. *Neurosci.Lett.* 1991; 131:71-74.
132. Ramon, Y. Cajal. Structure and connections of neurons. *Bull.Los.Angel.Neuro.Soc.* 1952; 17:5-46.
133. Mueller, B. K. Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu.Rev.Neurosci.* 1999; 22:351-388.
134. Tanaka, E. and Sabry, J. Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* 1995; 83:171-176.

135. Huber, A. B., Kolodkin, A. L., Ginty, D. D., and Cloutier, J. F. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu.Rev.Neurosci.* 2003; 26:509-563.
136. Goodman, C. S. Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu.Rev.Neurosci.* 1996; 19:341-377.
137. Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S. The molecular biology of axon guidance. *Science* 1996; 274:1123-1133.
138. Rathjen, F. G. Neural cell contact and axonal growth. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1991; 3:992-1000.
139. Keynes, R. J., Jaques, K. F., and Cook, G. M. Axon repulsion during peripheral nerve segmentation. *Development*. 1991; Suppl 2:131-139.
140. Raper, J. A. and Kapfhammer, J. P. The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain. *Neuron* 1990; 4:21-29.
141. Stahl, B., Muller, B., von, Boxberg Y., Cox, E. C., and Bonhoeffer, F. Biochemical characterization of a putative axonal guidance molecule of the chick visual system. *Neuron* 1990; 5:735-743.
142. Walter, J., Kern-Veits, B., Huf, J., Stolze, B., and Bonhoeffer, F. Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro. *Development*. 1987; 101:685-696.
143. Lumsden, A. G. and Davies, A. M. Earliest sensory nerve fibres are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature* 1983; 306:786-788.
144. Ming, G., Song, H., Berninger, B., Inagaki, N., Tessier-Lavigne, M., and Poo, M. Phospholipase C-gamma and phosphoinositide 3-kinase mediate cytoplasmic signaling in nerve growth cone guidance. *Neuron* 1999; 23:139-148.
145. Song, H. J., Ming, G. L., and Poo, M. M. cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 1997; 388:275-279.
146. Mark, M. D., Lohrum, M., and Puschel, A. W. Patterning neuronal connections by chemorepulsion: the semaphorins. *Cell Tissue Res.* 1997; 290:299-306.
147. Adams, R. H., Betz, H., and Puschel, A. W. A novel class of murine semaphorins with homology to thrombospondin is differentially expressed during early embryogenesis. *Mech.Dev.* 1996; 57:33-45.
148. Fiore, R. and Puschel, A. W. The function of semaphorins during nervous system development. *Front Biosci.* 2003; 8:s484-s499.
149. Messersmith, E. K., Leonardo, E. D., Shatz, C. J., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S., and Kolodkin, A. L. Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* 1995; 14:949-959.
150. Puschel, A. W., Adams, R. H., and Betz, H. Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. *Neuron* 1995; 14:941-948.
151. Yazdani, U. and Terman, J. R. The semaphorins. *Genome Biol.* 2006; 7:211.

152. Shepherd, I. T. and Raper, J. A. Collapsin-1/semaforin D is a repellent for chick ganglion of Remak axons. *Dev.Biol.* 1999; 212:42-53.
153. Kolodkin, A. L., Matthes, D. J., and Goodman, C. S. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 1993; 75:1389-1399.
154. Kobayashi, H., Koppel, A. M., Luo, Y., and Raper, J. A. A role for collapsin-1 in olfactory and cranial sensory axon guidance. *J.Neurosci.* 1997; 17:8339-8352.
155. Luo, Y., Raible, D., and Raper, J. A. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 1993; 75:217-227.
156. Klostermann, A., Lohrum, M., Adams, R. H., and Puschel, A. W. The chemorepulsive activity of the axonal guidance signal semaphorin D requires dimerization. *J.Biol.Chem.* 1998; 273:7326-7331.
157. Chedotal, A., Del Rio, J. A., Ruiz, M., He, Z., Borrell, V., de, Castro F., Ezan, F., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., and Soriano, E. Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development.* 1998; 125:4313-4323.
158. Koppel, A. M. and Raper, J. A. Collapsin-1 covalently dimerizes, and dimerization is necessary for collapsing activity. *J.Biol.Chem.* 1998; 273:15708-15713.
159. He, Z. and Tessier-Lavigne, M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997; 90:739-751.
160. Kolodkin, A. L., Levengood, D. V., Rowe, E. G., Tai, Y. T., Giger, R. J., and Ginty, D. D. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 1997; 90:753-762.
161. Behar, O., Golden, J. A., Mashimo, H., Schoen, F. J., and Fishman, M. C. Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature* 1996; 383:525-528.
162. Feiner, L., Webber, A. L., Brown, C. B., Lu, M. M., Jia, L., Feinstein, P., Mombaerts, P., Epstein, J. A., and Raper, J. A. Targeted disruption of semaphorin 3C leads to persistent truncus arteriosus and aortic arch interruption. *Development.* 2001; 128:3061-3070.
163. Kumanogoh, A., Marukawa, S., Suzuki, K., Takegahara, N., Watanabe, C., Ch'ng, E., Ishida, I., Fujimura, H., Sakoda, S., Yoshida, K., and Kikutani, H. Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature* 2002; 419:629-633.
164. Rohm, B., Ottemeyer, A., Lohrum, M., and Puschel, A. W. Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech.Dev.* 2000; 93:95-104.
165. Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L. H., Murakami, Y., Kalb, R. G., Fujisawa, H., and Strittmatter, S. M. Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 1999; 99:59-69.
166. Fujisawa, H. Discovery of semaphorin receptors, neuropilin and plexin, and their functions in neural development. *J.Neurobiol.* 2004; 59:24-33.

167. Feiner, L., Koppel, A. M., Kobayashi, H., and Raper, J. A. Secreted chick semaphorins bind recombinant neuropilin with similar affinities but bind different subsets of neurons in situ. *Neuron* 1997; 19:539-545.
168. Giger, R. J., Urquhart, E. R., Gillespie, S. K., Levengood, D. V., Ginty, D. D., and Kolodkin, A. L. Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* 1998; 21:1079-1092.
169. Chen, H., Chedotal, A., He, Z., Goodman, C. S., and Tessier-Lavigne, M. Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 1997; 19:547-559.
170. Nakamura, F., Tanaka, M., Takahashi, T., Kalb, R. G., and Strittmatter, S. M. Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron* 1998; 21:1093-1100.
171. Klagsbrun, M., Takashima, S., and Mamluk, R. The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv.Exp.Med.Biol.* 2002; 515:33-48.
172. Fujisawa, H., Ohta, K., Kameyama, T., and Murakami, Y. Function of a cell adhesion molecule, plexin, in neuron network formation. *Dev.Neurosci.* 1997; 19:101-105.
173. Gu, C., Limberg, B. J., Whitaker, G. B., Perman, B., Leahy, D. J., Rosenbaum, J. S., Ginty, D. D., and Kolodkin, A. L. Characterization of neuropilin-1 structural features that confer binding to semaphorin 3A and vascular endothelial growth factor 165. *J.Biol.Chem.* 2002; 277:18069-18076.
174. Lee, C. C., Kreusch, A., McMullan, D., Ng, K., and Spraggon, G. Crystal structure of the human neuropilin-1 b1 domain. *Structure*. 2003; 11:99-108.
175. Renzi, M. J., Feiner, L., Koppel, A. M., and Raper, J. A. A dominant negative receptor for specific secreted semaphorins is generated by deleting an extracellular domain from neuropilin-1. *J.Neurosci.* 1999; 19:7870-7880.
176. Gagnon, M. L., Bielenberg, D. R., Gechtman, Z., Miao, H. Q., Takashima, S., Soker, S., and Klagsbrun, M. Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2000; 97:2573-2578.
177. Pellet-Many, C., Frankel, P., Jia, H., and Zachary, I. Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem.J.* 2008; 411:211-226.
178. Shima, D. T. and Mailhos, C. Vascular developmental biology: getting nervous. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2000; 10:536-542.
179. Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., and Fujisawa, H. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*. 1999; 126:4895-4902.
180. Yamada, Y., Takakura, N., Yasue, H., Ogawa, H., Fujisawa, H., and Suda, T. Exogenous clustered neuropilin 1 enhances vasculogenesis and angiogenesis. *Blood*. 2001; 97:1671-1678.
181. Yuan, L., Moyon, D., Pardanaud, L., Breant, C., Karkkainen, M. J., Alitalo, K., and Eichmann, A. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development*. 2002; 129:4797-4806.

182. Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., and Holash, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407:242-248.
183. Bagnard, D., Vaillant, C., Khuth, S. T., Dufay, N., Lohrum, M., Puschel, A. W., Belin, M. F., Bolz, J., and Thomasset, N. Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J.Neurosci.* 2001; 21:3332-3341.
184. Cheng, H. J., Bagri, A., Yaron, A., Stein, E., Pleasure, S. J., and Tessier-Lavigne, M. Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron* 2001; 32:249-263.
185. Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G. I., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M. L., Goodman, C. S., Poo, M., Tessier-Lavigne, M., and Comoglio, P. M. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 1999; 99:71-80.
186. Kruger, R. P., Aurandt, J., and Guan, K. L. Semaphorins command cells to move. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2005; 6:789-800.
187. Yaron, A., Huang, P. H., Cheng, H. J., and Tessier-Lavigne, M. Differential requirement for Plexin-A3 and -A4 in mediating responses of sensory and sympathetic neurons to distinct class 3 Semaphorins. *Neuron* 2005; 45:513-523.
188. Kolodkin, A. L. and Ginty, D. D. Steering clear of semaphorins: neuropilins sound the retreat. *Neuron* 1997; 19:1159-1162.
189. Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279:509-514.
190. Mackay, D. J., Nobes, C. D., and Hall, A. The Rho's progress: a potential role during neuritogenesis for the Rho family of GTPases. *Trends Neurosci.* 1995; 18:496-501.
191. Van, Aelst L. and D'Souza-Schorey, C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 1997; 11:2295-2322.
192. Wittinghofer, A., Scheffzek, K., and Ahmadian, M. R. The interaction of Ras with GTPase-activating proteins. *FEBS Lett.* 1997; 410:63-67.
193. Waimey, K. E. and Cheng, H. J. Axon pruning and synaptic development: how are they per-plexin? *Neuroscientist*. 2006; 12:398-409.
194. Oinuma, I., Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. *Science* 2004; 305:862-865.
195. Rohm, B., Rahim, B., Kleiber, B., Hovatta, I., and Puschel, A. W. The semaphorin 3A receptor may directly regulate the activity of small GTPases. *FEBS Lett.* 2000; 486:68-72.
196. Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., and Yahara, I. Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat.Neurosci.* 2001; 4:367-373.
197. Bamburg, J. R. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 1999; 15:185-230.

198. Zhou, Y., Gunput, R. A., and Pasterkamp, R. J. Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem.Sci.* 2008; 33:161-170.
199. Mowla, S. J., Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G., and Murphy, R. A. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J.Biol.Chem.* 2001; 276:12660-12666.
200. Levi-Montalcini, R. and Angeletti, P. U. Nerve growth factor. *Physiol Rev.* 1968; 48:534-569.
201. Huang, E. J. and Reichardt, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu.Rev.Neurosci.* 2001; 24:677-736.
202. Sofroniew, M. V., Howe, C. L., and Mobley, W. C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu.Rev.Neurosci.* 2001; 24:1217-1281.
203. Chao, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat.Rev.Neurosci.* 2003; 4:299-309.
204. Patapoutian, A. and Reichardt, L. F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr.Opin.Neurobiol.* 2001; 11:272-280.
205. Miller, F. D. and Kaplan, D. R. On Trk for retrograde signaling. *Neuron* 2001; 32:767-770.
206. Glebova, N. O. and Ginty, D. D. Heterogeneous requirement of NGF for sympathetic target innervation in vivo. *J.Neurosci.* 2004; 24:743-751.
207. Frade, J. M. and Barde, Y. A. Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *Bioessays.* 1998; 20:137-145.
208. Rodriguez-Tebas, A., Dechant, G., Gotz, R., and Barde, Y. A. Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* 1992; 11:917-922.
209. Curtis, R., Adryan, K. M., Stark, J. L., Park, J. S., Compton, D. L., Weskamp, G., Huber, L. J., Chao, M. V., Jaenisch, R., Lee, K. F., and . Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins. *Neuron* 1995; 14:1201-1211.
210. Ozsarac, N., Weible, M., Reynolds, A. J., and Hendry, I. A. Activation of protein kinase C inhibits retrograde transport of neurotrophins in mice. *J.Neurosci.Res.* 2003; 72:203-210.
211. Thoenen, H. and Barde, Y. A. Physiology of nerve growth factor. *Physiol Rev.* 1980; 60:1284-1335.
212. Campenot, R. B. Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1977; 74:4516-4519.
213. Knoll, W. Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves. *Annu.Rev.Phys.Chem.* 1998; 49:569-638.
214. Phillips, K. S. and Cheng, Q. Recent advances in surface plasmon resonance based techniques for bioanalysis. *Anal.Bioanal.Chem.* 2007; 387:1831-1840.

215. Torrieri, P., Ceccarini, M., Macioce, P., and Petrucci, T. C. Biomolecular interactions by Surface Plasmon Resonance technology. *Ann.Ist.Super.Sanita.* 2005; 41:437-441.
216. Keusgen, M. Biosensors: new approaches in drug discovery. *Naturwissenschaften.* 2002; 89:433-444.
217. Miller, L. E., Weidler, C., Falk, W., Angele, P., Schaumburger, J., Scholmerich, J., and Straub, R. H. Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:1156-1163.
218. Whittaker, V. P., Michaelson, I. A., and Kirkland, R. J. The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ('synaptosomes'). *Biochem.J.* 1964; 90:293-303.
219. Li, Y., Ji, A., Weihe, E., and Schafer, M. K. Cell-specific expression and lipopolysaccharide-induced regulation of tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and TNF receptors in rat dorsal root ganglion. *J.Neurosci.* 2004; 24:9623-9631.
220. Kohm, A. P. and Sanders, V. M. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. *Pharmacol.Rev.* 2001; 53:487-525.
221. Krantic, S. Peptides as regulators of the immune system: emphasis on somatostatin. *Peptides.* 2000; 21:1941-1964.
222. Ganea, D., Rodriguez, R., and Delgado, M. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: players in innate and adaptive immunity. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* 2003; 49:127-142.
223. Koeck, F. X., Bobrik, V., Fassold, A., Grifka, J., Kessler, S., and Straub, R. H. Marked loss of sympathetic nerve fibers in chronic Charcot foot of diabetic origin compared to ankle joint osteoarthritis. *J.Orthop.Res.* 2009; 27:736-741.
224. Straub, R. H., Grum, F., Strauch, U., Capellino, S., Bataille, F., Bleich, A., Falk, W., Scholmerich, J., and Obermeier, F. Anti-inflammatory role of sympathetic nerves in chronic intestinal inflammation. *Gut.* 2008; 57:911-921.
225. Rich, R. L. and Myszka, D. G. Survey of the year 2005 commercial optical biosensor literature. *J.Mol.Recognit.* 2006; 19:478-534.
226. Vaisocherova, H., Mrkvova, K., Piliarik, M., Jinoch, P., Steinbachova, M., and Homola, J. Surface plasmon resonance biosensor for direct detection of antibody against Epstein-Barr virus. *Biosens.Bioelectron.* 2007; 22:1020-1026.
227. Phadke, K., Fouts, R. L., Parrish, J. E., and Butler, L. D. Evaluation of the effects of various anti-arthritis drugs on type II collagen-induced mouse arthritis model. *Immunopharmacology.* 1985; 10:51-60.
228. Hillefors, M., Gioio, A. E., Mameza, M. G., and Kaplan, B. B. Axon viability and mitochondrial function are dependent on local protein synthesis in sympathetic neurons. *Cell Mol.Neurobiol.* 2007; 27:701-716.
229. Mok, S. A. and Campenot, R. B. A nerve growth factor-induced retrograde survival signal mediated by mechanisms downstream of TrkA. *Neuropharmacology.* 2007; 52:270-278.

230. del, Rey A., Wolff, C., Wildmann, J., Randolph, A., Hahnel, A., Besedovsky, H. O., and Straub, R. H. Disrupted brain-immune system-joint communication during experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58:3090-3099.
231. Imai, S., Tokunaga, Y., Kontinen, Y. T., Maeda, T., Hukuda, S., and Santavirta, S. Ultrastructure of the synovial sensory peptidergic fibers is distinctively altered in different phases of adjuvant induced arthritis in rats: ultramorphological characterization combined with morphometric and immunohistochemical study for substance P, calcitonin gene related peptide, and protein gene product 9.5. *J.Rheumatol.* 1997; 24:2177-2187.
232. Hasko, G. Receptor-mediated interaction between the sympathetic nervous system and immune system in inflammation. *Neurochem.Res.* 2001; 26:1039-1044.
233. del, Rey A., Kabiersch, A., Petzoldt, S., and Besedovsky, H. O. Involvement of noradrenergic nerves in the activation and clonal deletion of T cells stimulated by superantigen in vivo. *J.Neuroimmunol.* 2002; 127:44-53.
234. Straub, R. H., Stebner, K., Harle, P., Kees, F., Falk, W., and Scholmerich, J. Key role of the sympathetic microenvironment for the interplay of tumour necrosis factor and interleukin 6 in normal but not in inflamed mouse colon mucosa. *Gut.* 2005; 54:1098-1106.
235. Straub, R. H. Autoimmune disease and innervation. *Brain Behav.Immun.* 2007; 21:528-534.
236. Ansel, J. C., Brown, J. R., Payan, D. G., and Brown, M. A. Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells. *J.Immunol.* 1993; 150:4478-4485.
237. Wilder, R. L. Hormones and autoimmunity: animal models of arthritis. *Baillieres Clin.Rheumatol.* 1996; 10:259-271.
238. Kishimoto, S. The regeneration of substance P-containing nerve fibers in the process of burn wound healing in the guinea pig skin. *J.Invest Dermatol.* 1984; 83:219-223.
239. Reynolds, M. L. and Fitzgerald, M. Long-term sensory hyperinnervation following neonatal skin wounds. *J.Comp Neurol.* 1995; 358:487-498.
240. Katayama, I. and Nishioka, K. Substance P augments fibrogenic cytokine-induced fibroblast proliferation: possible involvement of neuropeptide in tissue fibrosis. *J.Dermatol.Sci.* 1997; 15:201-206.
241. Levine, J. D., Clark, R., Devor, M., Helms, C., Moskowitz, M. A., and Basbaum, A. I. Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science* 1984; 226:547-549.
242. Nilsson, J., Von Euler, A. M., and Dalsgaard, C. J. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 1985; 315:61-63.
243. Mukouyama, Y. S., Shin, D., Britsch, S., Taniguchi, M., and Anderson, D. J. Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* 2002; 109:693-705.
244. Perez, E., Lopez-Briones, L. G., Gallar, J., and Belmonte, C. Effects of chronic sympathetic stimulation on corneal wound healing. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 1987; 28:221-224.

245. Wucherpfennig, A. L., Chiego, D. J., Jr., and Avery, J. K. Tritiated thymidine autoradiographic study on the influence of sensory and sympathetic innervation on periodontal wound healing in the rat. *Arch.Oral Biol.* 1990; 35:443-448.
246. Chen, H., He, Z., and Tessier-Lavigne, M. Axon guidance mechanisms: semaphorins as simultaneous repellents and anti-repellents. *Nat.Neurosci.* 1998; 1:436-439.
247. Kolodkin, A. L. Semaphorin-mediated neuronal growth cone guidance. *Prog.Brain Res.* 1998; 117:115-132.

## 8 Anhang

### 8.1 Lebenslauf

Name: Alexander Fassold

Geburtsdatum: 15.09.1980

Geburtsort: Neuendettelsau

Staatsangehörigkeit: deutsch

#### Schulbildung

1986 - 1990 Grundschule Merkendorf

1990 - 1999 Gymnasium Windsbach, Allgemeine Hochschulreife  
(Abitur) mit großem Latinum

#### Zivildienst

1999 - 2000 Zivildienst im mobilen sozialen Hilfsdienst bei der  
Arbeiterwohlfahrt Ansbach

#### Studium

Oktober 2000 - September 2002 Grundstudium im Fach Biologie an der Universität  
Würzburg

Oktober 2002 - Dezember 2004 Hauptstudium im Fach Biologie in den Fächern  
Biotechnologie, Mikrobiologie und Pharmazeutische  
Biologie an der Universität Würzburg

Januar 2005 - Oktober 2005 Diplomarbeit, durchgeführt an der Universität Würzburg  
im Bereich Biotechnologie mit dem Thema „Herstellung  
von Alginatmatrizen“

#### Promotion

15. März 2006 Beginn der Promotion am Universitätsklinikum  
Regensburg in der Klinik und Poliklinik für Innere  
Medizin I bei Prof. Dr. R.H. Straub zum Thema: „Die  
Blockade des Neuropilin-2 als mögliches therapeu-  
tisches Prinzip bei Arthritis“

## 8.2 Publikationen

### Originalarbeiten

**Fassold A.**, Falk W., Anders S., Hirsch T., Mirsky VM., Straub RH.

Soluble neuropilin-2, a nerve repellent receptor, is increased in rheumatoid arthritis synovium and aggravates sympathetic fiber repulsion and arthritis.

Arthritis Rheum. 2009; 60: 2892-2901.

**Fassold A.**, Straub RH.

A new assay for nerve fiber repulsion.

Ann. N.Y. Sci. 2010; im Druck

Koeck FX., Bobrik V., **Fassold A.**, Grifka J., Kessler S., Straub RH.

Marked loss of sympathetic nerve fibers in chronic Charcot foot of diabetic origin compared to ankle joint osteoarthritis.

J Orthop Res. 2009; 27: 736-741.

Straub RH., Rauch L., **Fassold A.**, Lowin T., Pongratz G.

Neuronally released sympathetic neurotransmitters stimulate splenic interferon-gamma secretion from T cells in early type II collagen-induced arthritis.

Arthritis Rheum. 2008; 58: 3450-3460.

Straub RH., Wolff C., **Fassold A.**, Hofbauer R., Chover-Gonzalez A., Richards LJ., Jessop DS.

Antinflammatory role of endomorphins in osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and adjuvant-induced polyarthritis.

Arthritis Rheum. 2008; 58: 456-466.

### 8.3 Vorträge

**Forschungswochenende der Klinik und Poliklinik der Inneren Medizin I, Universität Regensburg (November 2008, Regenstauf):**

Lösliches NPN-2 ist bei RA-Patienten erhöht und verstärkt den sympathischen Nervenfaserrückzug und die Arthritis

**The 7th Meeting of the German-Endocrine-Brain-Immune Network (Juli 2009, Frankfurt):**

Interception of repulsion factors: a possible treatment of rheumatoid arthritis?

### 8.4 Posterpräsentationen

**Fassold A., Falk W., Straub R.H.: The blockade of neuropilin-2 as a new therapeutic principle in arthritis**

The 6th Meeting of the German-Endocrine-Brain-Immune Network (GEBIN), Freiburg (03/2007)

**Fassold A., Falk W., Straub R.H.: Is neuropilin-2 a possible target for the treatment of arthritis?**

37<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGfI), Heidelberg (09/2007)

**Fassold A., Falk W., Straub R.H.: Is there a role of neuropilin-2 in arthritis?**

14<sup>th</sup> PsychoNeuroimmunology Research Society (PNIRS), Arcachon, Frankreich (06/2007)

**Fassold A., Falk W., Straub R.H.: The role of sympathetic nerve fibers in rheumatoid arthritis tested by neuropilin-2 immunofluorescence**

36<sup>th</sup> Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), Berlin (09/2008)

**Fassold A.**, Falk W., Straub R.H.: Soluble neuropilin-2, a nerve repellent receptor, is increased in RA synovium and aggravates sympathetic fiber repulsion and arthritis  
4<sup>th</sup> International Conference on Neuro Endocrine Immunology in Rheumatic Diseases (NEIRD), Santa Margherita, Italien (05/2009)

**Fassold A.**, Falk W., Straub R.H.: Interception of repulsion factors: a possible treatment of rheumatoid arthritis?

37<sup>th</sup> Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), Köln (09/2008)

## 8.5 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Straub für die Ermöglichung dieser interessanten und spannenden Arbeit. Er unterstützte mich während der gesamten Arbeit mit seiner hervorragenden wissenschaftlichen Betreuung und seiner ständigen Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Seine Aufmunterungen und sein Optimismus waren mir eine große Hilfe bei der Durchführung der Arbeit. Durch den Besuch von zahlreichen Kongressen und Fortbildungsveranstaltungen ermöglichte er es mir, viele interessante naturwissenschaftliche und persönliche Erfahrungen zu sammeln.

Ausdrücklich danke ich Herrn Prof. Dr. Götferich für die unkomplizierte Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit. Er zeigte stets Interesse am Fortschritt meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Falk danke ich für sein stets offenes Ohr und seine große Unterstützung und Hilfestellung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Angehörigen der AG Falk (Daniela, Lisa, Kirstin, Philipp) für die nette Zusammenarbeit und ihre tolle Unterstützung, bei allem was mit Molekularbiologie zu tun hatte bedanken. Ohne sie wäre vieles nicht möglich gewesen.

Bei Peter Härle möchte ich mich für die anfängliche Unterstützung bei den Tierversuchen bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank den Herren Dr. Hirsch und Prof. Mirsky für die Zusammenarbeit und die Hilfen bei den Messungen der Oberflächenplasmonresonanz.

Ein herzliches Dankeschön all meinen Laborkollegen (Georg, Silvia, Luise, Angelika, Christine, Madlen, Torsten, Steffi, Christoph) für ihre immerwährende Unterstützung

und die nette und unkomplizierte Laboratmosphäre, zu der jeder seinen Beitrag geleistet hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Forschungsbaus für die Hilfe bei den verschiedensten Fragestellungen.

Zudem möchte ich allen anderen nicht genannten Personen danken, die in der einen oder anderen Form zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich noch meiner Familie danken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, die mich moralisch und finanziell unterstützt hat, mir oft gut zusprach und mich stets auf meinem Weg begleitete.

Vielen Dank!

## 8.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitates gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 22.12.2009

---

(Alexander Fassold)