

Zirkadiane Rhythmen bei rheumatoider Arthritis



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Stefanie Haas

aus Forchheim

im Jahr 2010

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 09. November 2010

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. med. Rainer H. Straub,
Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Förster

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. med. Frank Schweda
1. Gutachter (1. Prüfer): Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Förster
2. Gutachter (2. Prüfer): Prof. Dr. med. Rainer H. Straub
3. Prüfer: Prof. Dr. rer. nat. Jens Schlossmann

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
 2.1 Zirkadiane Rhythmen	3
2.1.1 Die molekulare Uhr	4
2.1.1.1 BMAL1	5
2.1.1.2 CLOCK	6
2.1.1.3 Die Period-Proteine	6
2.1.1.4 Cryptochrom	7
2.1.1.5 REV-ERB α	8
2.1.2 Entrainment und Synchronisation	9
 2.2 Arthritis	10
2.2.1 Rheumatoide Arthritis	10
2.2.1.1 Pathophysiologie	10
2.2.1.2 Ätiologie und Pathogenese	11
2.2.1.3 Zytokine bei der rheumatischen Arthritis	13
2.2.1.3.1 Tumornekrosefaktor (TNF)	13
2.2.1.3.2 Interleukin 1 β (IL-1 β)	14
2.2.1.3.3 Interleukin 6 (IL-6)	16
2.2.2 Osteoarthrose	17
 2.3 Gegenstand der Arbeit	19
3 Material und Methoden	21
 3.1 Material	21
3.1.1 Geräte	21
3.1.2 Materialien	21
3.1.3 Chemikalien & Lösungen	22
3.1.4 Antikörper	25
3.1.5 Kits & ELISAs	25
3.1.6 Primer	25

3.1.7 Synovialgewebe	26
3.2 Methoden	28
3.2.1 Immunofluoreszenzfärbung des Synovialgewebes	28
3.2.2 Blut	29
3.2.2.1 Expressionsprofile der Uhrengene	29
3.2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung der Leukozyten	31
3.2.3 Fibroblasten	32
3.2.3.1 Ziellinie MH7A	32
3.2.3.2 Primäre synoviale Fibroblasten	32
3.2.3.3 Kontrollfibroblasten	33
3.2.4 Ablauf der 36- und 72-Stunden-Experimente	33
3.2.5 Stabilität von IL-1 β und TNF unter Zellkulturbedingungen	35
3.2.5 Etablierung der Western Blots für BMAL1, CLOCK und PER1	36
4 Ergebnisse.....	38
4.1 Uhrenproteine im Synovialgewebe.....	38
4.1.1 BMAL1, CLOCK, PER1 und PER2 sind im Synovialgewebe vorhanden	38
4.1.2 BMAL1 und PER1 zeigen keine Oszillationen im Synovialgewebe	39
4.2 Uhrenproteine im Blut.....	40
4.2.1 Unterschiedliche Expressionsprofile der Uhrengene in Normalpersonen.....	41
4.2.2 Blutzellen zeigen keine Synchronizität	42
4.3 Expressionsmuster der Uhrengene in der Zielllinie MH7A	45
4.3.1 IL-1 β hemmt die Expression der Uhrengene über 36 Stunden	46
4.3.2 Hemmwirkung von IL-1 β und TNF über 72 Stunden zum Teil bestätigt	47
4.3.3 Dosis-Wirkungskurve von IL-1 β und TNF auf die Uhrengeneexpression	49
4.4 Effekte von IL-1β und TNF auf primäre OA-SFs	52
4.4 Effekte von IL-1β und TNF auf RA-SFs	59
4.5 Effekte von IL-1β und TNF auf gesunde Kontrollfibroblasten (NFs)	65
4.6 Etablierung der Western Blots für BMAL1, CLOCK und PER1	71
5 Diskussion.....	72
5.1 Keine Rhythmik im Synovialgewebe?	73
5.2 Blutzellen zeigen keine Synchronizität	74
5.3 Zytokine beeinträchtigen die Rhythmik der Zielllinie MH7A	77
5.4 Dosisabhängige Hemmung der Uhrengene durch IL-1β und TNF.....	78

5.5 Zytokine beeinträchtigen die Rhythmik primärer Fibroblasten.....	79
5.6 Uhrenproteine im Western Blot	82
6 Literaturverzeichnis	84
7 Anhang.....	93
 7.1 Abkürzungen	93
 7.2 Publikationsliste.....	95
7.2.1 Vorträge.....	95
7.2.2 Posterpräsentationen	95
7.2.3 Posterpreise.....	96
 7.3 Danksagung	97

1 Zusammenfassung

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Krankheit, bei der es letztendlich zur Zerstörung der betroffenen diarthrodialen Gelenke kommt. Nach Jahrzehntelanger Forschung wird immer deutlicher, dass es sich hierbei nicht um ein einziges Krankheitsbild handelt, und es somit auch nicht die eine richtige Therapieform geben kann. Viele Aspekte, die je nach Patientengruppe zum Ausbruch der Krankheit zu deren Chronifizierung führen oder zumindest dazu beitragen, hat man bereits erforscht und kann heutzutage relativ erfolgreich dagegen vorgehen. Aber noch immer gibt es Patienten, die auf die aktuellen Therapieansätze kaum oder nur schlecht ansprechen. Deswegen wird auch weiterhin intensiv an Alternativen geforscht.

Ziel dieser Arbeit war es einen etwaigen Zusammenhang zwischen der rheumatoiden Arthritis und einem möglichen zirkadianen Rhythmus der synovialen Fibroblasten des Kniegelenks zu untersuchen.

Die Proteine BMAL1, CLOCK, PER1 und PER2 konnten als Komponenten der molekularen Uhr im Kniegelenk nachgewiesen werden. Eine rhythmische Veränderung der Anzahl BMAL1- oder PER1-positiver Zellen in der Synovialmembran von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), Osteoarrose (OA) oder von Traumapatienten (Co) innerhalb eines Zeitraums von zehn Stunden konnte mittels Immunfluoreszenz nicht festgestellt werden.

Auch untersuchte Blutzellen von gesunden Spendern zeigten keinerlei Rhythmik der vorhandenen Uhrenproteine weder in Bezug auf die Abundanz des Proteins noch auf seine subzelluläre Lokalisation. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass im Synovialgewebe keine Rhythmik sichtbar wurde, da vor allem bei RA- und OA-Patienten die Gelenkkinnenhaut stark von Immunzellen aus dem Blut infiltriert ist. Auf mRNA-Ebene war zwar eine Oszillation von *Bmal1*, *Per1* und *Per2* festzustellen, es ergaben sich jedoch zwei grundsätzlich unterschiedliche Expressionsprofile. Blut stellt somit allgemein kein Referenzsystem dar, um eine gestörte Rhythmik des Patienten zu diagnostizieren.

Die Fibroblastenzelllinie MH7A ermöglichte es die zirkadiane Rhythmik eines einzelnen Zelltyps über mehr als 24 Stunden hinweg zu untersuchen. Nach anfänglicher Synchronisation der Zellen konnte eine Oszillation der Uhren-*mRNAs* ausgelöst werden. Diese wurde durch die Zytokine IL-1 β und TNF anfangs maßgeblich gehemmt, was aber in Folgeexperimenten nicht mehr in diesem Ausmaß bestätigt werden konnte. Anhand einer Dosis-Wirkungskurve wurde deutlich, dass vor allem Zytokin-Konzentrationen < 1 ng/ml eine Reduzierung der Uhren-*mRNAs* zur Folge hatten.

Des Weiteren wurden die Expressionsmuster von primären RA- und OA-Fibroblasten (RA-SFs, OA-SFs) für die oben genannten Gene im Verlauf von 72 Stunden ermittelt und mit Kontrollfibroblasten (NFs) verglichen. Auch hier wurde der Einfluss von TNF und IL-1 β auf die Genexpression untersucht. Die Verlaufskurven machten deutlich, wie sich diese Zytokine auf die Oszillationen der Uhrengene-mRNA-Abundanzen über den ganzen Untersuchungszeitraum auswirkten. Die Amplituden bei den NFs wurden verstärkt und die Expression meist generell gesteigert. Bei den OA-SFs kam es dagegen durch IL-1 β oder TNF zu einer verringerten mRNA-Expression der Uhrengene, was vor allem an den fehlenden Anfangspeaks deutlich wurde. Die Verlaufskurven bei den RA-SFs dagegen blieben teilweise relativ unbeeinflusst durch IL-1 β und TNF (*Per1*, *Per3* und *Rev-Erb α*) oder zeigten verstärkte Oszillationen bzw. mRNA-Level (*Bmal1*, *Clock*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*).

Bei den NFs könnten die Zytokine ein *Resetting*-Signal darstellen, das *Per1* und *Per2* hochreguliert und dadurch zu einer Phasenverschiebung des Rhythmus führt. Somit wird der Zelle wiederum ermöglicht, auf die akute Entzündungssituation zu reagieren, indem durch die Uhr kontrollierte Gene (*clock controlled genes*; CCGs) vermehrt exprimiert werden.

Dass die OA-SFs genau entgegengesetzt auf die proinflammatorischen Zytokine reagieren, könnte eine Folge dessen sein, dass sie ihnen bereits seit längerem im arthritischen Gelenk ausgesetzt waren. Aufgrund dieser chronischen Exposition verliert der Stimulus seine Wirkung, energieaufwendige Reaktionen zu induzieren. Diese Desensibilisierung verhindert so, dass die Zelle Ressourcen unnötig verschwendet.

RA-SFs zeichnen sich durch einen aggressiven, krebsähnlichen Phänotyp aus. Ihre Proliferationsrate ist erhöht und sie sind in der Lage in die umliegenden Gewebe im Gelenk zu invadieren. Die RA-SFs weisen keine Zeichen der Desensibilisierung wie die OA-SFs auf. Sie sind weiterhin in der Lage auf die Stimuli IL-1 β und TNF zu reagieren, wenn auch nicht in dem gleichen Ausmaß wie NFs.

Diese Ergebnisse machen einerseits deutlich, dass die Vorstellung der Synchronizität in peripheren Geweben nur dann Bestand hat, wenn man einheitliche Zellpopulationen betrachtet. Andererseits wird deutlich, dass Zytokine auf Expression der Uhrengene in synovialen Fibroblasten einen großen Einfluss ausüben. Diese veränderte Rhythmisik könnte somit langfristig für eine Entartung der Fibroblasten, die sich in einem aktivierten Phänotyp mit gesteigerter Mitoserate manifestiert, verantwortlich sein.

2 Einleitung

2.1 Zirkadiane Rhythmen

Das Wort ‚zirkadian‘ kommt aus dem Lateinischen und setzt sich zusammen aus den Wörtern *circum* für ‚ungefähr‘ und *dies* für ‚Tag‘. Unter zirkadianen Rhythmen versteht man also solche, deren Zyklus etwa 24 Stunden umfasst. Diese Rhythmik konnte bisher bei vielen verschiedenen Organismen nachgewiesen werden, je nach Spezies unterscheidet sie sich jedoch geringfügig. So besitzt z.B. die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* einen 23,7 Stunden-Rhythmus, wogegen der des Menschen 24,2 Stunden umfasst. (1) Diese Rhythmik ist offensichtlich in einer Vielzahl von Lebewesen. Pflanzen öffnen morgens ihre Blüten und strecken ihre Blätter der Sonne entgegen, abends hingegen werden sie wieder geschlossen. Mäuse und Ratten verbleiben als nachtaktive Tiere tagsüber in ihrem Bau und begeben sich während der Nacht auf Futtersuche. Solch rhythmisches Verhalten wurde oft als Reaktion auf den Tag-Nacht-Rhythmus gesehen. Heute weiß man, dass dieses Verhalten aber auch dann fortbesteht, wenn ständige Dunkelheit herrscht. Das Kennzeichen der biologischen, zirkadianen Rhythmen ist also, dass sie auch ohne äußere Signale im Takt bleiben. Diese zirkadiane Rhythmik ermöglicht es den Organismen entsprechend gewisser Gegebenheiten ihrer Umwelt, wie z.B. dem Tag-Nacht-Wechsel, zu leben und diese teilweise auch vorwegzunehmen. So beginnen Pflanzen bereits vor Sonnenaufgang, Chlorophyll für die bevorstehende Photosynthese zu produzieren. (2)

Für diverse physiologische Vorgänge im Menschen konnte bereits eine zirkadiane Rhythmik festgestellt werden. Dazu zählen unter anderem der Schlaf-Wach-Rhythmus, die Regulation von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Blutdruck und die Zellregeneration. Auch Hirnströme und die Produktion von Hormonen weisen deutliche Schwankungen im Tagesverlauf auf. (3;4)

Generiert wird der zirkadiane Rhythmus der Säugetiere im suprachiasmatischen Nucleus (SCN) der den zentralen Schrittmacher des Körpers darstellt und in der Lage ist, seine Rhythmik auf andere periphere Gewebe zu übertragen. Dies geschieht sehr wahrscheinlich einerseits über direkten neuronalen Kontakt und andererseits über lösliche Faktoren, wobei die genauen Mechanismen noch unklar sind. (3;5) Lokalisiert ist der SCN im Hypothalamus als paarige Ansammlung von ca. 20.000 Nervenfasern direkt über dem Chiasma der beiden Sehnerven. Die Rhythmik des SCN erhält sich selbst aufrecht und benötigt keinerlei Signale von außerhalb, kann aber durch externe Zeitgeber feingesteuert werden. Der wichtigste Zeitgeber für den SCN ist sicherlich das Licht. Diese Lichtwahrnehmung geschieht

unabhängig von den klassischen Photorezeptoren der Retina, den Zapfen und Stäbchen. Das Licht wird über einen Subtyp retinaler Ganglionzellen detektiert, die Melanopsin als Photopigment besitzen. Von diesen Zellen gelangt die Information über die retino-hypothalamischen Bahn zum SCN und kann dort die zirkadiane Rhythtmik beeinflussen. Das *Entrainment*, also die Feinsteuerung des SCN über den Zeitgeber Licht, ist somit unabhängig von der visuellen Wahrnehmung. (6-8)

2.1.1 Die molekulare Uhr

Die Maschinerie der molekularen Uhr ist in jedem einzelnen SCN-Neuron vorhanden und wurde bisher auch schon in vielen peripheren Geweben wie Herz, Leber oder Niere nachgewiesen. (9) Sie besteht aus mehreren, interagierenden Uhrenproteinen, die transkriptionelle und translationale Rückkopplungsschleifen bilden. Man unterscheidet zwischen positiven Komponenten, also solchen, die die Transkription fördern, und negativen Elementen, die die Transkription der Uhrengene hemmen.

Die beiden Transkriptionsfaktoren BMAL1 und CLOCK sind die wichtigsten positiven Komponenten. Andere Proteine der molekularen Uhr haben eine repressorische Funktion auf die Transkription von Uhrengenen und solchen die von der Uhr direkt gesteuert werden (*clock controlled genes*; CCGs). Zu diesen Uhrengenen zählen in erster Linie die Periods (PER1, PER 2, PER 3) und die Cryptochrome (CRY1, CRY2), aber auch REV-ERB α . Die Hemmung geschieht indirekt, indem sie die aktivierende Wirkung von BMAL1 und CLOCK blockieren.

BMAL1 und CLOCK verbinden sich zu einem Heterodimer, lagern sich an eine E-Box im Promotor des jeweiligen Zielgens an und induzieren so dessen Transkription. Die E-Box ist ein Enhancer-Element und entspricht der Konsensussequenz CACGTG. BMAL1 und CLOCK können über ihr *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH)-Motiv damit interagieren.

Durch BMAL1 und CLOCK induzierte Uhrengene sind unter anderem alle *Pers* und *Crys*, sowie *Rev-erb α* . Die mRNA der *Pers* und *Crys* gelangt aus dem Zellkern und wird im Zytoplasma durch die Ribosomen translatiert. PERs und ein CRYs lagern sich zu Dimeren verschiedener Kombinationen zusammen, translozieren zurück in den Kern, interagieren dort mit dem BMAL1/CLOCK-Komplex und unterdrücken so deren transkriptionsfördernde Wirkung. Somit werden auch keine PER- und CRY-Proteine mehr hergestellt (Abb. 1). Durch Abbau der vorhanden PERs und CRYs sinkt deren Anzahl, bis sie schließlich nicht mehr in der Lage sind, den BMAL/CLOCK-Komplex zu inhibieren und die Transkription kann wieder beginnen. (10-12)

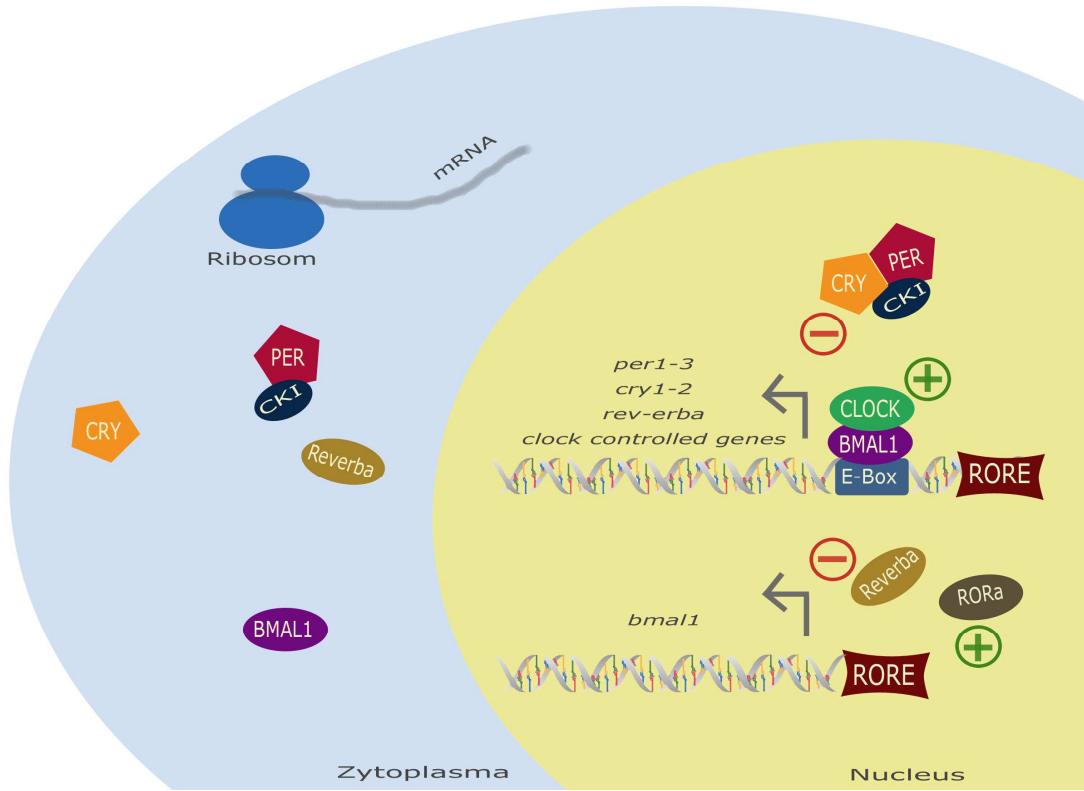


Abb. 1: Schema der molekularen Uhr: Die Transkription von *Per1-3*, *Cry1-2*, *Rev-Erb α* und CCGs wird durch das Heterodimer BMAL1/CLOCK induziert. Die mRNA dieser Gene wird im Zytosoma translatiert. PERs und CRYs bilden Komplexe unterschiedlicher Zusammensetzung, die durch die Caseinkinase I ϵ (CKI ϵ) stabilisiert werden und zurück in den Zellkern translozieren, wo sie ihre eigene Transkription inhibieren. REV-ERB α und ROR α bilden eine Hilfsschleife, die über ROR-Elemente die Transkription jeweils hemmen bzw. verstärken.

2.1.1.1 BMAL1

BMAL1 (*brain and muscle ARNT like protein 1*; auch MOP3) ist ein bHLH-Transkriptionsfaktor, der zusammen mit CLOCK die Transkription verschiedener Gene über eine E-Box im Promotor induziert und vielleicht das wichtigste der positiven Komponenten der molekularen Uhr darstellt.

Die Transkription von *Bmal1* selbst wird wohl hauptsächlich über ein *retinoic acid-related orphan receptor response element* (RORE) innerhalb seines Promoters reguliert, an das REV-ERB α und ROR kompetitiv binden können und dadurch die Transkription von *bmal1* jeweils unterdrücken bzw. steigern. (13) Diese Regulation über ROREs scheint zumindest in der Maus sowohl nötig als auch ausreichend zu sein, die Transkription von *Bmal1* zu steuern. (14) *Bmal1*-defiziente Mäuse sind in Abwesenheit von Zeitgebersignalen arrhythmisch, weshalb man davon ausging, dass BMAL1 essentiell für die Funktion der

molekularen Uhr ist, und dass es kein anderes Protein mit redundanter Funktion gibt. (15;16) Shi S. et al. dagegen haben kürzlich beschrieben, dass BMAL1 durch sein Paralog BMAL2 ersetzt werden kann. Da aber die *Bmal2*-Transkription ebenfalls über BMAL1 induziert wird, kommt es in *Bmal1*-Knockout-Mäusen zu einem funktionellen Doppel-Knockout was somit die Arrhythmie zur Folge hat. (17)

2.1.1.2 CLOCK

CLOCK (*circadian locomotor output cycles kaput*) ist neben BMAL1 die zweite positive Komponente der molekularen Uhr. Wie auch BMAL1 ist es ein bHLH-Transkriptionsfaktor und induziert zusammen mit diesem die Transkription verschiedener Uhrengene und CCGs. Obwohl widersprüchliche Angaben in der Literatur zu finden sind, wird meist beschrieben, dass *Clock* nicht rhythmisch exprimiert wird, sondern relativ konstante mRNA-Level im Tagesverlauf aufweist. (4;15;18;19) Entscheidender als die alleinige Expression scheint bei CLOCK die subzelluläre Lokalisation zu sein. So folgt die Verteilung von CLOCK zwischen Zytoplasma und Zellkern einer 24-Stunden-Rhythmik. (20)

Neben CLOCK kann auch *neuronal PAS domain protein 2* (NPAS2) mit BMAL1 interagieren und einen transkriptionsaktivierenden Komplex bilden. NPAS2 wird jedoch vorwiegend nur im Vorderhirn von Säugetieren exprimiert. (16)

Vor ein paar Jahren wurde eine weitere Eigenschaft von CLOCK entdeckt: Es besitzt eine intrinsische Histon-Azetyltransferase-(HAT) Aktivität. CLOCK ist also in der Lage, die Histone H3 und H4 zu azetylieren, was allgemein mit einer Transkriptionsaktivierung verbunden wird. Diese HAT-Aktivität von CLOCK wird durch die Anwesenheit von BMAL1 verstärkt. (16) Außerdem kann CLOCK neben Histonen auch BMAL1 azetylieren. Man geht davon aus, dass dies die Interaktion von BMAL1 mit CRY1 erleichtert und so wiederum zur Unterdrückung der Transkription beiträgt. (21)

2.1.1.3 Die Period-Proteine

Die Period-Proteine (PER) 1-3 bilden zusammen mit den Cryptochromen (CRY) 1 und 2 die negativen Regulationselemente. PERs und CRYs formen in verschiedenen Kombinationen Komplexe miteinander, die im Zellkern dann die Transkription durch BMAL1 und CLOCK unterbinden können. Diese Komplexe werden bereits im Zytoplasma gebildet und translozieren anschließend in den Zellkern. (10;11;22) Bei dieser Translokation in den Nukleus spielt die Caseinkinase I ϵ (CKI ϵ) eine wichtige Rolle, indem sie die Periods phosphoryliert. Im Fall von mPER3 führt das zu einem Abbau über das Ubiquitin-

Proteasom-System. Dieser schnelle Abbau ist vielleicht der Grund dafür, weshalb mPER3 im Gegensatz zu mPER1 und mPER2 nicht essentiell für eine funktionierende molekulare Uhr in der Maus ist. (10;23) Im Fall von PER1 und PER2 verhindert deren Bindung an CRY, dass das durch CKI ϵ phosphorylierte PER ubiquitiniert und abgebaut wird. (11;22;23) Ein Modell besagt, dass über die jeweilige Bindung an PER CRY und CKI ϵ in räumliche Nähe gebracht werden, CRY durch CKI ϵ dann phosphoryliert wird und anschließend der Komplex CRY-CKI ϵ -PER in den Nukleus gelangt. (23;24)

Licht, der wohl stärkste Zeitgeber, führt im SCN von Mäusen zu einem raschen Anstieg von *mPer1* und *mPer2*-mRNA. *mPer3* dagegen ist über Licht nicht induzierbar. Allgemein kommt es beim *Resetting*, also dem Zurücksetzen der Uhr, anfangs immer zu einem starken Anstieg der Expression von *Per*, die über *cAMP response element-binding protein* (CREB) vermittelt wird. (10;25) Dabei spielt der Zeitpunkt des Zeitgebersignals eine wichtige Rolle. Licht innerhalb der ersten Stunden der subjektiven Nacht führen zur Expression von *mPer*. Zu dieser Zeit nimmt die *mPer*-Konzentration eigentlich bereits wieder ab. Durch die erneute Expression kommt es zu einer Phasenverzögerung. Licht innerhalb der letzten Nachtstunden bewirkt dagegen eine verkürzte Phase, da die bereits ansteigende *mPer*-Menge zusätzlich gesteigert wird. (8;25)

Für mPER2 konnte eine direkte Interaktion mit BMAL1 und CLOCK gezeigt werden, was deren transkriptionsfördernde Wirkung hemmt. (26) Dieser Rolle als negativer Regulator steht aber nun auch eine Wirkung als positiver Regulator gegenüber. So wurde festgestellt, dass mPER2 die Transkription von *Bmal1* aktiviert. (10;27)

Neben seiner Aufgabe als Uhrengene scheint *mPer2* außerdem noch eine weitere als Tumorsuppressor zu haben, da PER2-defiziente Mäuse spontan Tumore entwickeln. (3;4;11)

2.1.1.4 Cryptochrome

Die Cryptochromes bilden die zweite Gruppe der negativen Regulatoren des zirkadianen Rhythmus. Im Vergleich zu den Periods sind sie die stärkeren Inhibitoren, wobei CRY1 über CRY2 dominiert. (10;26) CRY1 kann direkt mit dem BMAL1/CLOCK-Komplex interagieren, was wahrscheinlich durch die CLOCK-vermittelte Azetylierung von BMAL1 ermöglicht wird. (21) Mutationen im Bereich der CRYs haben unterschiedliche Auswirkungen. So weisen CRY1-defiziente Mäuse eine Rhythmisierung mit verkürzten Zeitintervallen auf, wogegen CRY2-defiziente Mäuse eine verlängerte Rhythmisierung zeigen. Fehlen bei Mäusen dagegen beide CRYs verhalten sie sich anscheinend normal. Sobald allerdings der Zeitgeber Licht wegfällt und sie in konstanter Dunkelheit gehalten werden, kommt es zu einem totalen Verlust der zirkadianen Rhythmisierung. Die CRYs spielen also eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung

der Rückkopplungsschleifen. Neben der direkten Interaktion mit BMAL1 ist dabei sicher auch die Stabilisierung der PERs von Bedeutung. (10)

Bei den Cryptochromen scheinen die posttranslationalen Modifikationen (PTMs) von größerer Bedeutung zu sein als eine rhythmische Veränderung der mRNA-Menge. So konnte für mCry1 eine zwar rhythmische Expression festgestellt werden, bei mCry2 dagegen nicht. Beide Proteine oszillierten jedoch stark und robust im SCN der Maus. (10)

Neben der Funktion als Uhrengegen wird auch über eine mögliche Funktion als Photorezeptor und dessen Beitrag zum Entrainement diskutiert. Das CRY1 der Pflanze *Arabidopsis thaliana* weist Ähnlichkeiten zu deren Photolyase auf. Die Photolyase ist ein Enzym das mit Hilfe von blauem oder UV-A-Licht DNA-Schäden reparieren kann. CRY1 bei *Arabidopsis thaliana* ist dazu jedoch nicht in der Lage. Auch beim Menschen ähneln die CRY-Proteine der Photolyase, ohne deren Aktivität zu besitzen. Ihr Beitrag zum Entrainment ist bislang noch nicht geklärt. Man geht aber davon aus, dass sie zusammen mit den Photorezeptoren der Retina für die nichtvisuelle Lichtwahrnehmung zuständig sind und diese an den SCN weitergeben. Diese Photorezeptoren umfassen die klassischen Stäbchen und Zapfen mit Opsin als Sehpigment, sowie einen dritten Typ retinaler Ganglienzellen mit Melanopsin. (10;28)

2.1.1.5 REV-ERB α

REV-ERB α (auch NR1D1) ist im Gegensatz zu den bereits genannten Komponenten der molekularen Uhr kein Teil der Hauprückkopplungsschleifen und somit auch nicht zwingend notwendig für die Generierung der zirkadianen Rhythmik. Vielmehr bildet es zusammen mit ROR α eine eigene den Rhythmus stabilisierende Rückkopplungsschleife, wobei REV-ERB α die Transkription hemmt und ROR α diese induziert. REV-ERB α bindet entweder als Monomer an *retinoic acid-related orphan receptor response elements* (ROREs) oder als Homodimer an Rev-DR2-Bindungsstellen im Promotor der Zielgene und hemmt so deren Transkription. (14;19;29;30) Bis vor kurzem wurde REV-ERB α noch als orphaner Kernrezeptor bezeichnet. Mittlerweile konnte jedoch Häm als Ligand identifiziert werden. (30;31)

Rev-Erb α ist ebenso ein Uhrengegen wie ein CCG, also ein Gen dessen Transkription direkt über Uhrentypen gesteuert wird. Die Transkription von *Rev-Erb α* wird durch das BMAL1-CLOCK-Dimer und ROR α induziert, gehemmt wird sie dagegen über REV-ERB α selbst, das wie ROR α auch an RORE bindet. REV-ERB α kann die Transkription von *Bmal1* unterdrücken und verbindet so die positive und negativen Rückkopplungsschleifen der molekularen Uhr. (29)

2.1.2 Entrainment und Synchronisation

Der SCN wird als der zentrale Taktgeber des Körpers betrachtet. Seine Rhythmik persistiert ohne jegliche äußere Signale. Aus verschiedenen Gründen ist es jedoch sinnvoll, den Rhythmus ständig anhand solcher Signale, auch Zeitgeber genannt, anzupassen. So umfasst die reguläre Dauer eines Zyklus bei den meisten Organismen nicht exakt 24 Stunden. Zudem umfasst die Dauer eines Tages nicht genau 24 Stunden und die Zeiten der Sonnenaufgänge und -untergänge variieren im Verlauf eines Jahres.

Licht ist der wichtigste Zeitgeber für den SCN und kann dessen Rhythmik entscheidend beeinflussen. Die Signalwahrnehmung erfolgt mittels eines speziellen Typs retinaler Ganglionzellen (RGZs). Diese RGZs zählen wie die Zapfen und Stäbchen zu den Photorezeptoren der Retina, sind aber im Gegensatz zu diesen nicht an der visuellen Lichtwahrnehmung beteiligt. Anstelle des Photopsins bzw. Rhodopsins besitzen sie als Photopigment das Melanopsin. Die Axone dieser RGZs projizieren direkt in den SCN und formen so die so genannten retinohypothalamische Bahn (*retinohypothalamic tract; RHT*). (7;8) Die Lichtinformation wird so von den RGZs auf die SCN-Neurone übertragen. Diese Übertragung erfolgt mittels der Neurotransmitter Glutamat und PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*). (32-35) Durch das Glutamat kommt es in den SCN-Neuronen zur Ausschüttung von intrazellulärem Calcium, was wiederum zur Aktivierung von Calcium/Calmodulin oder auch zur Phosphorylierung von $\text{Ca}^{2+}/\text{cAMP}$ -responsive element binding protein (CREB) führt. Durch die Bindung von P-CREB an das cAMP response element (CRE) im Promotor von *Per1* wird dessen Transkription induziert, und dieser Schritt kann so die Periodenlänge des Rhythmus beeinflussen. (10;36;37)

Vom SCN aus wird die zentrale Rhythmik auf periphere Gewebe übertragen. Einerseits geschieht dies über direkte neuronale Innervation, wie z.B. zu anderen Bereichen des Hypothalamus, andererseits wahrscheinlich über humorale Faktoren, die aber bisher noch nicht im Detail bekannt sind. (3;12;38) Es gibt aber immer mehr Hinweise darauf, dass Glucocorticoide zu diesen humoralen Faktoren zählen. (39;40)

Die peripheren Uhren können nicht nur durch den SCN synchronisiert werden, sondern adjustieren sich außerdem anhand weiterer Zeitgeber. Wie bei Mäusen gezeigt werden konnte, stellt die Nahrungsaufnahme einen wichtigen Zeitgeber dar. Mäuse sind nachtaktive Tiere, weshalb sie auch während dieser Zeit fressen. Wenn sie nur noch tagsüber gefüttert werden und ihnen nachts Futter vorenthalten wird, kommt es zu einer Phasenverschiebung der zirkadianen Rhythmen in Leber, Herz, Pankreas und weiteren Organen. Deren Rhythmik verhält sich anschließend entgegengesetzt zum Rhythmus des SCN, welcher unbeeinflusst bleibt. Es kommt hierbei zu einer Entkopplung peripherer Uhren vom zentralen Oszillatoren.

Durch den Wegfall des äußeren Zeitgebers wird die Kopplung aber sehr schnell wiederhergestellt. (41;42)

2.2 Arthritis

2.2.1 Rheumatoide Arthritis

Rheumatoide Arthritis (RA), auch als chronische Polyarthritis bezeichnet, ist eine chronisch-entzündliche Gelenkerkrankung die in Deutschland ca. 800.000 Menschen betrifft, weltweit sogar um die 21 Millionen. Sie zeichnet sich aus durch eine fortschreitende Zerstörung und Deformierung der diarthrodialen Gelenke, vor allem die der Finger und der Hand. Der Patient kann diese Gelenke somit nur noch eingeschränkt unter Schmerzen oder gar nicht mehr bewegen. Die Ätiologie der rheumatoiden Arthritis ist trotz intensiver Forschung noch immer unklar. Auch wenn sie oft als eine Autoimmunerkrankung bezeichnet wird, wird es jedoch immer deutlicher dass rheumatoide Arthritis als ein Sammelbegriff für eine Vielzahl von Krankheitsbildern zu verstehen ist, deren Ursachen ebenso vielfältig sind. (43)

2.2.1.1 Pathophysiologie

Das gesunde Synovium ist eine Bindegewebsschicht, die die innere Oberfläche der Gelenkkapsel auskleidet. Diese Schicht ist wiederum in zwei Schichten unterteilbar: Das 2-3 Zellen dicke Lining und das darunter liegende, bindegewebsreiche Sublining. Das Lining setzt sich hauptsächlich aus zwei Zelltypen zusammen: Den Makrophagen-ähnlichen Synoviozyten Typ A und den Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten Typ B. (44;45)

Der durch das Synovium abgegrenzte Gelenkspalt ist gefüllt mit Synovialflüssigkeit. Diese besteht in erster Linie aus Plasmadialysat das durch das Synovium in den Gelenkspalt diffundiert. Ihre hohe Viskosität kommt durch das von den synovialen Fibroblasten produzierte Hyaluronan zustande. (44) Durch die Synovialflüssigkeit wird eine möglichst reibungsfreie Bewegung des Gelenks ermöglicht. Daneben zählt die Versorgung des Knorpels zu ihren Aufgaben. (46)

Bei der RA führt die chronische Entzündung zu einer Verdickung der Synovialmembran. Das Lining wächst auf ca. acht Zellschichten an und bildet einen Pannus, der in den hyalinen Knorpel und den subchondralen Knochen einwächst und diese so zerstört. (47) Diese

Verdickung ist zum einen durch Hyperplasie und Proliferation der Synoviozyten bedingt, zum anderen durch das Einwandern von Immunzellen wie Monozyten und Lymphozyten. (48;49)

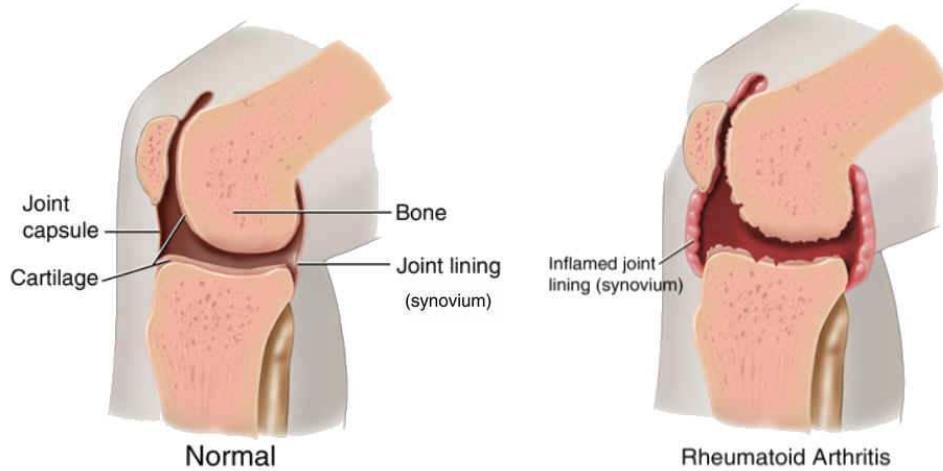


Abb. 2: Vergleich eines gesunden und eines rheumatischen Kniegelenks (Modifiziert nach http://www.summitmedicalgroup.com/library/adult_health/rheumatoid_arthritis)

2.2.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Bis heute ist die Ätiologie der RA nicht bekannt. Allerdings sind diverse Faktoren beschrieben, die die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass ein Mensch im Laufe seines Lebens an RA erkrankt. Die Suche nach dem entscheidenden Auslöser dieser Erkrankung, sofern überhaupt ein singulärer Faktor dafür verantwortlich ist, verlief bisher erfolglos.

Wie bei vielen Autoimmunkrankheiten tritt RA bei Frauen ca. doppelt bis dreimal so häufig auf wie bei Männern. (50) Zunehmendes Alter ist ein weiterer Risikofaktor. So erkranken Frauen meist zwischen 40 und 50 und Männer etwas später zwischen 55 und 75 Jahren. (51;52)

In 70 % aller RA-Patienten können Autoantikörper gegen CCPs (*cyclic citrullinated proteins*) gefunden werden. Die Citrullinierung ist eine regulär vorkommende posttranskriptionale Modifikation von Proteinen. Der Nachweis von Anti-CCP-Antikörpern ist ein spezifischer Marker für die RA, dessen Vorhandensein einen aggressiven Krankheitsverlauf zur Folge hat. (43;44) Ein weiterer prognostischer Marker ist der serologische Nachweis von Rheumafaktoren. Diese autoreaktiven Antikörper erkennen den Fc-Teil der Immunglobuline G (IgG) und sind in ca. 80% aller RA-Patienten nachweisbar. Allerdings können sie auch

teilweise bei gesunden Personen oder Patienten mit anderen chronisch-entzündlichen Krankheiten gefunden werden und sind somit nicht RA-spezifisch. (53) Autoantikörper und Rheumafaktoren werden von B-Zellen und Plasmazellen gebildet und sind oft schon Jahre vor Auftreten der ersten klinischen Symptome im Serum nachweisbar. (43;51)

Auch eine genetische Disposition kann zur Entstehung der RA beitragen. So haben z.B. Geschwister von RA-Patienten ein ca. vierfach erhöhtes Risiko ebenfalls an RA zu erkranken. (43) Von besonderer Bedeutung ist hier das Allel *HLA (human leukocyte antigen)-DRB1*. *HLA-DRB1* kodiert für HLA-DR4, eine β-Kette des MHC-II-Moleküls (*major histocompatibility complex class II*), über das Antigene den CD4⁺- T-Zellen präsentiert werden. Für eine Sequenz von fünf Aminosäuren dieses Moleküls konnte eine starke Korrelation mit RA nachgewiesen werden, was auch als *shared epitope* Hypothese bezeichnet wird. (43;48) Neben dem *HLA-DRB1*-Allel könnte unter anderem auch für die Gene *ptpn22* und *stat4* ein Zusammenhang zur RA bestehen. *Ptpn22* kodiert für LYP, einer Tyrosinkinase die eine entscheidende Rolle beim T-Zell-Rezeptor-Signaling spielt. *Stat4* kodiert für STAT4 (*signal transducer and activator of transcription 4*), welches an einer IL-12-vermittelten Th1-Immunantwort beteiligt ist. Außerdem kann IL-23 über STAT4 das Überleben und die Proliferation von Th17-Zellen beeinflussen. (43)

Viele Erkenntnisse der letzten Jahre weisen darauf hin, dass RA, zumindest teilweise eine T-Zell-vermittelte Krankheit ist. Im entzündeten Synovialgewebe und der Synovialflüssigkeit findet man eine großen Anzahl aktiverter CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. Darüber hinaus stehen die oben genannten Moleküle HLA-DR4, LYP und STAT4 alle in Verbindung mit T-Zellen und deren Aktivierung. Eine Hypothese besagt, dass HLA-DR4 und eine Variante des LYP die Selektion der T-Zellen im Thymus so beeinflussen, dass es vermehrt zur Entstehung autoreaktiver T-Zellen kommt. (43;54)

In Gelenken von RA-Patienten konnte außerdem das Zytokin IL-17 nachgewiesen werden, welches in OA-Gelenken nicht gefunden werden konnte. IL-17 wird von Th17-Zellen produziert, stimuliert Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Osteoklasten und Chondrozyten zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und trägt so zur Zerstörung des Gelenks bei. (43;55) Des Weiteren wurden in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten vermehrt regulatorische T-Zellen (T_{reg}) gefunden. Deren eigentliche Aufgabe ist das Eindämmen des Entzündungsprozesses, wozu sie aber in der manifestierten RA nicht mehr in der Lage sind. (43)

Neben den Lymphozyten als typische Immunzellen tragen auch synoviale Fibroblasten (SFs) entscheidend zur Pathogenese der RA bei. Die RA-SFs sind im Vergleich zu normalen SFs aktiviert und phänotypisch verändert. Sie sind in der Lage, sich an den Gelenkknorpel anzuhafoten und anschließend in die extrazelluläre Matrix (EZM) des hyalinen Knorpels zu

invadieren und ihn mittels Proteasen zu zerstören. Ob diese Aktivierung von den RA-SFs selbst gesteuert wird oder eine Folge der lokal vorhandenen proinflammatorischen Zytokine darstellt, ist nicht bekannt. (49)

Letztendlich entsteht die RA aus einem Zusammenspiel verschiedener Zelltypen, einer genetischen Disposition und auch durch Umweltfaktoren, die je nach Patient einen unterschiedlichen Beitrag zur Pathogenese leisten.

2.2.1.3 Zytokine bei der rheumatoiden Arthritis

Die bedeutendsten proinflammatorischen Zytokine bei der rheumatoiden Arthritis sind nach aktuellem Kenntnisstand Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin 1 β (IL-1 β) und Interleukin 6 (IL-6). Alle drei besitzen jeweils pleiotrope Wirkungen auf verschiedene Zelltypen und Gewebe die sich auch teilweise überlappen. (56) TNF und IL-1 β sind Teil des angeborenen Immunsystems und sind in der Lage alleinig die Entzündungskaskade in Gang zu setzen. IL-6 spielt sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunität eine Rolle und wird erst später in dieser Kaskade aktiviert.

2.2.1.3.1 Tumornekrosefaktor (TNF)

Seinen Namen hat TNF aufgrund der ursprünglichen Beobachtung, Nekrose von malignen Tumoren zu induzieren. (57) Bald darauf wurde jedoch seine bedeutende Rolle bei Entzündungsprozessen festgestellt. In chronischen Entzündungskrankheiten wie der rheumatoiden Arthritis steht TNF im Fokus auf der Suche nach neuen Therapieansätzen, da man davon ausgeht, dass es an der Spitze des Zytokinnetzwerkes und der Entzündungskaskade steht. (58) TNF konnte im RA-Synovium nachgewiesen werden, wo es vor allem von Makrophagen und T-Zellen gebildet wird. (51)

TNF existiert in zwei Formen: einer membrangebundenen nichtglykosylierten Form und einer löslichen Form. Zunächst wird ein transmembranes Vorläuferprotein (26 kDa) gebildet, das dann mittels TNF-converting-enzyme (TACE; auch ADAM17) gespalten wird. Die dadurch entstandenen 17 kDa-großen löslichen TNF-Monomere lagern sich zum aktiven Homotrimer zusammen. (57;59;60)

TNF wird von einer Vielzahl von Zellen gebildet, in erster Linie jedoch von aktivierten Makrophagen. (61) Aber auch B- und T-Zellen, sowie Mastzellen oder Monozyten können TNF sezernieren. (60)

Die TNF-Trimere können mit zwei Rezeptortypen interagieren: Zum einen mit TNF-Rezeptor Typ I (TNF-RI, auch p55; 55 kDa) und zum anderen TNF-Rezeptor Typ II (TNF-RII, auch p75; 75 kDa). TNF-RI ist auf den meisten Zelltypen vertreten, wogegen TNF-RII hauptsächlich auf Immunzellen gefunden wird. Obwohl TNF eine geringere Affinität zu TNF-RI besitzt, vermittelt es aber über diesen Rezeptor den Großteil seiner biologischen Wirkungen. (61) Hat ein TNF-Trimer an ein Rezeptortrimer gebunden, wird ein TNF-Rezeptor-assoziierter-Faktor (TRAF) an die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors rekrutiert. TRAF wiederum führt über MAP-Kinasen zur Aktivierung von NF κ B oder Aktivierungsprotein 1 (AP-1) und so zur Expression verschiedener Gene. Durch die Bindung von TNF an TNF-RI kann es jedoch auch zur Apoptose einer Zelle kommen. In diesem Fall wird nicht TRAF sondern TRADD (*TNF-RI associated death domain protein*) rekrutiert und es kommt über die Aktivierung von Caspasen zum programmierten Zelltod. (57;59-61) Bindet TNF an den Rezeptor stimuliert es die Zelle wiederum, diesen vermehrt zu produzieren, womit es zu einer positiven Rückkopplung und zu einer Aufschaukelung des Effektes kommt. (57) Allerdings werden diese TNF-Rezeptoren auch kontinuierlich in löslicher Form von der Zelle abgegeben, was zu einer Neutralisierung von TNF führt und so eine weitere Möglichkeit zur Regulation bietet. (59)

Während einer Entzündungsreaktion hat TNF vielfältige Wirkungen auf das Endothel. Endothelzellen sezernieren nach TNF-Stimulation Prostaglandine und Stickstoffmonoxid (NO), was zur Erweiterung von Gefäßen, gesteigerter Durchblutung und dadurch zu einer erhöhten Leukozytenzahl am Entzündungsort führt. TNF steigert außerdem die Produktion von Zelloberflächenmolekülen, an denen sich Leukozyten anheften können, um von dort aus ins Gewebe zu migrieren. Dies wird ebenfalls durch TNF ermöglicht, da es die Produktion von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) steigert, die die extrazelluläre Matrix verdauen und somit das Gefäß permeabilisieren. (57;60;60)

Bei der RA wird TNF im Gelenk hauptsächlich von den Makrophagen der Synovialmembran gebildet. TNF stimuliert dort die Freisetzung weiterer Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, sowie GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), TGF und IFN γ . (57;59)

2.2.1.3.2 Interleukin 1 β (IL-1 β)

Interleukin 1 β (IL-1 β) hat TNF-ähnliche Effekte, obwohl sich weder die beiden Zytokine noch die jeweiligen Rezeptoren ähneln. Im Gegensatz zu TNF wirkt IL-1 β jedoch nicht apoptotisch und führt auch in hohen Konzentrationen nicht zu einem septischen Schock. (60)

Das humane IL-1 existiert in zwei Formen: IL-1 α und IL-1 β . Es handelt sich nicht um unterschiedliche Splicevarianten der gleichen mRNA, sondern beide Formen werden von jeweils einem sieben Exons umfassenden Gen auf Chromosom 2 kodiert. Das hat zur Folge,

dass beide Formen nur zu ca. 26 % homolog sind. (60;62) Trotz dieser Unterschiede werden sie zu IL-1 zusammengefasst, da sie strukturell ähnlich sind, beide dieselben Rezeptoren IL-1R Typ I (biologisch aktiv) und Typ II (biologisch inaktiv) binden und dadurch auch die gleichen biologischen Eigenschaften besitzen. (62;63)

IL-1 wird von vielen verschiedenen Zelltypen gebildet, Hauptquelle sind jedoch mononukleäre phagozytierende Zellen, also Monozyten und Makrophagen, aber auch Endothelzellen, T-Zellen, (synoviale) Fibroblasten und Thrombozyten. (60;62) Die Transkription von IL-1 wird auf Stimuli wie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder Zytokine wie TNF hin induziert. (60)

IL-1 α und IL-1 β werden als Pro-Polypeptid von 33 kDa translatiert und erst durch die Spaltung mittels Caspase I, einer Cysteinprotease, zum reifen 17 kDa-großen Polypeptid prozessiert. (60)

IL-1 α wird kaum sezerniert sondern verbleibt entweder intrazellulär oder in der Plasmamembran von Monozyten oder B-Zellen verankert. IL-1 β dagegen wird größtenteils sezerniert und kann somit auch systemisch wirken. (62;63)

Bindet IL-1 an den IL-1R Typ I wird das Adapterprotein MyD88 an die zytoplasmatische TIR-Domäne (Toll/IL-Rezeptor-Domäne) des Rezeptors rekrutiert. Anschließend binden auch IL-1R-assoziierte Kinase 4 (IRAK4) und TNF Rezeptor assoziierter Faktor 6 (TRAF6) an den Komplex. Über mehrere Phosphorylierungsschritte wird schließlich NF κ B aktiviert, was dann zur Expression verschiedener Gene führt. (60)

IL-1 β hat ähnliche Wirkungen wie TNF, arbeitet mit diesem auch teilweise zusammen, was dann zu synergistischen Effekten in der Immunantwort führen kann. (60;64) Die Wirkung von IL-1 β im Rahmen von ca. 1 pM bis 1 nM tritt bereits nach wenigen Minuten ein. Es wirkt auf Fibroblasten und T-Zellen proliferativ, rekrutiert T- und B-Lymphozyten mittels Chemotaxis und stimuliert die Freisetzung verschiedener Peptide aus Hypothalamus und Hypophyse (ACTH, Somatostatin, Corticotropin-Releasing-Hormone, Endorphine). (62)

IL-1 β hat in geringen Konzentrationen vor allem eine lokale Wirkung als Entzündungsmediator, in dem es die Prostaglandinsynthese stimuliert. (65) Außerdem bewirkt es die Steigerung von Oberflächenmolekülen auf Endothelzellen. So können vermehrt Leukozyten aus dem Blutstrom an das Endothel adhärieren und von dort aus ins entzündete Gewebe migrieren. In höheren Konzentrationen gelangt IL-1 β in den Blutkreislauf und führt zu systemischen Effekten: Es kommt zu Fieber, die Leber produziert Akute-Phase-Proteine und im Knochenmark werden vermehrt Neutrophile und Thrombozyten gebildet. (60)

IL-1 ist das einzige Zytokin für das bisher ein natürlich vorkommender Antagonist gefunden wurde. IL-1Ra wird ständig von Makrophagen sezerniert und bietet so eine Möglichkeit, die Wirkung von IL-1 zu regulieren. (65)

IL-1 β wurde sowohl in der Synovialflüssigkeit als auch im Synovium bei RA-Patienten in hohen Konzentrationen gefunden. (58;65)

2.2.1.3.3 Interleukin 6 (IL-6)

Neben TNF und IL-1 β spielt auch IL-6 eine große Rolle bei der RA, da es hier, wie auch bei einigen anderen Entzündungskrankheiten, in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden kann. (1;66;67) Auf Stimuli wie Mikroorganismen oder Zytokine (TNF, IL-1 β) hin wird IL-6 vor allem von Makrophagen, Fibroblasten, aktivierten T-Zellen und einigen anderen Zelltypen gebildet. (60;67;68) Es bindet den IL-6-Rezeptor (IL-6R), der zum Teil als transmembranes Protein und zum Teil als löslicher Rezeptor vorliegt. Die konventionelle Signaltransduktion findet über den in der Zellmembran verankerten IL-6R statt. Bindet IL-6 daran so kommt es zu einer Anlagerung von zwei Glykoproteinen 130 (gp130). Gp130 initiiert die Signaltransduktion und führt so über Januskinase 1 (Jak1) und *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) bzw. über den Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK)-Signalpfad zur Transkription verschiedener Gene.

Bindet IL-6 an den löslichen IL-6R, so bindet dieser Komplex wiederum an gp130 auf der Zelloberfläche, führt zu dessen Dimerisierung und anschließend zur Signaltransduktion, was als trans-Signaling bezeichnet wird.

Der transmembrane IL-6R kommt nur auf Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und Hepatozyten vor. Somit sind nur diese Zellen in der Lage auf IL-6 über die konventionelle Signaltransduktion zu reagieren. Das gp130 dagegen kommt auf praktisch allen Zellen vor. Im arthritischen Gelenk findet hauptsächlich trans-Signaltransduktion statt, da die meisten Synoviozyten keinen IL-6R auf ihrer Oberfläche aufweisen. Der lösliche IL-6R konnte jedoch in Synovialflüssigkeit und Serum nachgewiesen werden. (60;67;69)

IL-6 hat diverse Wirkungen die zur Entstehung und zur Chronifizierung der RA beitragen können. So stimuliert es die Bildung von Akute-Phase-Proteinen in der Leber, die unter anderem zur Komplementaktivierung und zur Bildung weiterer proinflammatorischer Zytokine führen. Des Weiteren fördert IL-6 die Differenzierung und Antikörperproduktion von B-Zellen, wodurch es eventuell auch zur Entstehung von Autoantikörpern kommen könnte. T-Zellen werden durch IL-6 aktiviert und die Differenzierung von T-Zellen und Makrophagen wird stimuliert. Die Gelenkzerstörung wird dadurch begünstigt, dass IL-6 auf

Synoviozyten proliferierend wirkt, Osteoklasten aktiviert und die MMP-Produktion steigert. (67)

2.2.2 Osteoarrose

Osteoarrose ist die weltweit häufigste Form der Arthritis. Sie betrifft meist die Kniegelenke und geht einher mit Schmerzen, eingeschränkter Beweglichkeit, und sie verringert so die Lebensqualität der Patienten massiv. Ursache dafür ist die Zerstörung des Gelenks, vor allem durch den Abbau des hyalinen Gelenkknorpels, Erosionen des subchondralen Knochens, eine Verengung des Gelenkspalts, Ausbildung von Osteophyten, aber auch einer Synovitis. (46;70;71) Osteophyten sind ein typisches Merkmal der OA. Sie entstehen aus Periostzellen die sich zu Chondrozyten differenzieren, um dann über den Prozess der chondralen Ossifikation knöcherne Ausbildungen am Rand des Gelenks zu bilden. (72;73)

Der hyaline Knorpel, der den Knochen innerhalb des Gelenks überzieht, besteht zum überwiegenden Teil aus extrazellulärer Matrix (EZM) und dient dazu Druckbelastungen abzufangen und eine möglichst reibungsfreie Bewegung der Gelenke zu ermöglichen. Diese EZM wiederum besteht hauptsächlich aus Proteoglykanen (z.B. Aggrecan) und Typ II-Kollagen. In sie eingebettet findet man Chondrozyten, die die EZM synthetisieren und instand halten. Bei der OA kommt es zu einem vermehrten Abbau der EZM, der letztendlich nicht kompensiert werden kann, und somit zu einer verringerten und zweitklassigen Knorpelmasse führt. Der Abbau geschieht über spezielle Proteasen, die Proteoglykane spalten, und MMPs, die Kollagen verdauen. All diese Proteasen werden von den Chondrozyten selbst synthetisiert. (46;73)

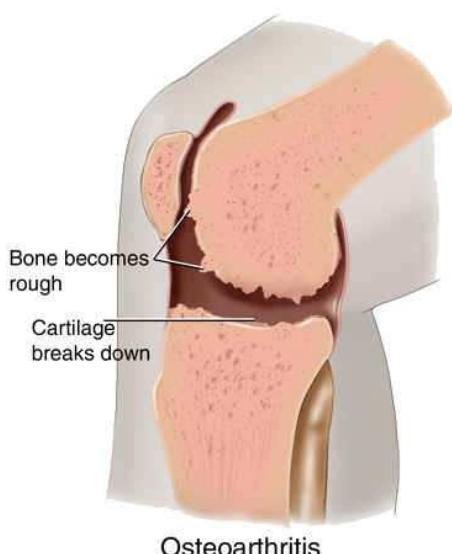


Abb. 3: Bei der Osteoarrose kommt es zur Zerstörung des hyalinen Knorpels, der den Knochen innerhalb des Gelenkspalts überzieht. Zusätzlich kommt es zur Ausbildung von Osteophyten, die wahrscheinlich fehlgeschlagene Reparaturversuche darstellen und zu einer rauerer Oberfläche des Gelenks führen. (Modifiziert nach http://www.summitmedicalgroup.com/library/adult_health/rheumatoid_arthritis)

Zu den Risikofaktoren einer OA zählen unter anderem zunehmendes Alter, Übergewicht, starke mechanische Beanspruchung oder Trauma des Gelenks, aber auch genetische Faktoren. (46;71;74)

Bisher ist OA noch nicht heilbar, sondern nur in Bezug auf die Symptome behandelbar. Dabei will man vor allem Schmerzen mindern, ein Fortschreiten der Krankheit verhindern und die Mobilität des Patienten so weit wie möglich wiederherstellen bzw. erhalten. (74)

2.3 Gegenstand der Arbeit

Seit langem ist bekannt, dass Symptome der rheumatoiden Arthritis (RA) entsprechend der Tageszeit variieren. So schmerzen z.B. die Gelenke der Patienten in den frühen Morgenstunden besonders stark. Dieser Schmerz lässt zwar im Laufe des Tages nach, wird aber über Nacht wieder stärker. Ebenso verhält es sich mit der Steifheit der Gelenke und deren eingeschränkter Funktion. (1) Diese Tatsachen lassen darauf schließen, dass der reguläre zirkadiane Rhythmus eine Rolle bei der RA spielt.

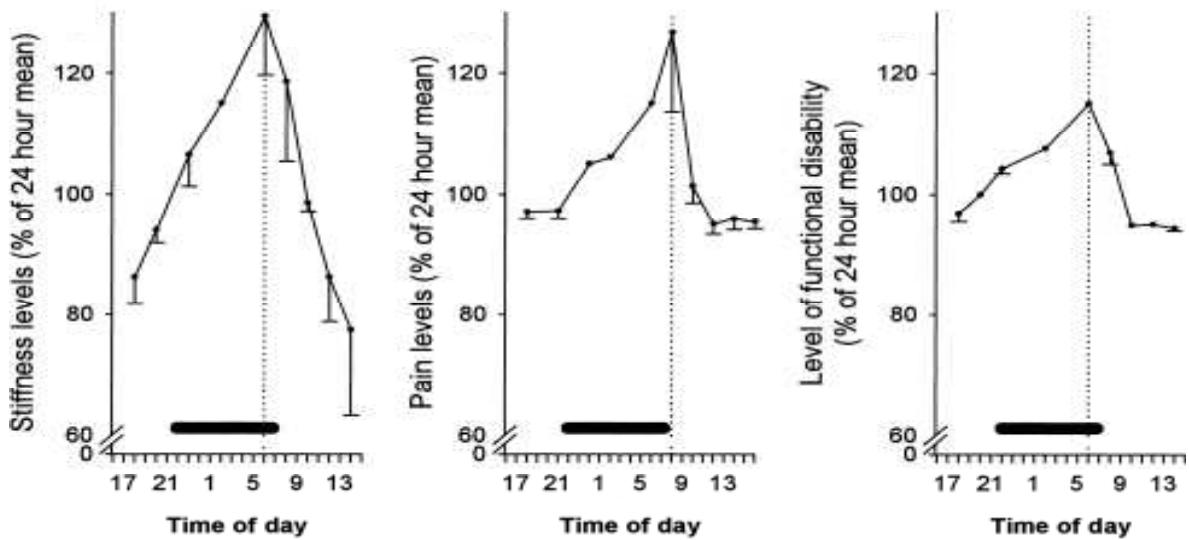


Abb. 4: Die Symptome von RA-Patienten wie Steifheit, Schmerzen und funktionale Einschränkung der Gelenke variieren im Tagesverlauf. Sie sind morgens immer am stärksten ausgeprägt, verlieren aber im weiteren Verlauf an Intensität. (Modifiziert nach (1))

Diesem Zeitverlauf folgen neben den Krankheitssymptomen auch andere Parameter, die mit der RA in Verbindung stehen. So konnte für TNF und IL-6 gezeigt werden, dass die regulären Schwankungen der Plasmakonzentrationen während des Tages zwar prinzipiell bei RA-Patienten noch vorhanden sind, aber deren Maximalwerte zum einen stark erhöht sind und zum anderen auch erst ca. ein bis drei Stunden später erreicht werden. (1;75)

Für viele andere Krankheitsbilder konnte bereits nachgewiesen werden, dass ein gestörter zirkadianer Rhythmus ursächlich ist oder zumindest dazu beiträgt. Die nahe liegenden Beispiele sind Jetlag oder Schlafstörungen. Aber auch bei Krebs, Depressionen, dem metabolischen Syndrom oder Entzündungskrankheiten spielt die zirkadiane Rhythmik eine Rolle. (3;4;76;77)

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob auch im Synovialgewebe eine molekulare Uhr vorhanden ist, und ob diese bei RA-Patienten möglicherweise in ihrer Funktion gestört ist. Außerdem sollte der Einfluss proinflammatorischer Zytokine, die mit der RA assoziiert sind, auf die Expressionprofile der Uhrengene untersucht werden. Diese Erkenntnisse tragen dazu bei, die vielfältigen Facetten der RA-Erkrankung besser zu verstehen. Auf deren Grundlage könnten auch langfristig spezifischere Therapien für die Behandlung der RA entwickelt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Bezeichnung	Firma
Kryotom Leica CM 3050 S	Leica, Wetzlar
Mikroskop Leica DM RBE	Leica, Wetzlar
MS1 Minishaker	IKA, Staufen
384 well Thermal Cycler 7900 HT	Applied Biosystems, Schweiz
Biofuge fresco 13	Heraeus, Hannover
8-Channel Matrix Electronic Equalizer 384	Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA
Mikroskop Leica DM IRB	Leica, Wetzlar
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
MegaFuge 1.0 R	Heraeus, Hannover
Brutschränke	Heraeus, Hannover
Power Supply	Pharmacia Biotech, Freiburg
Sterilwerkbank	Heraeus, Hannover
Wasserbad SW-20C	Julabo, Seelbach
X Cell Sure Lock Western Blot System	Invitrogen, Karlsruhe
Light Cycler II	Roche Diagnostics, Mannheim
NanoDrop	PeqLab, Erlangen

3.1.2 Materialien

Bezeichnung	Firma
15 ml /50 ml Reaktionsgefäß	BD Falcon, Heidelberg
25 cm ² / 75 cm ² Zellkulturflaschen	Corning, Corning, NY, USA
6-well Platten	BD Falcon, Heidelberg
Absolute QPCR Seal Sheets	Thermo Scientific, Dreieich
Cell Strainer 70 µm, Nylon	BD Falcon, Heidelberg
Culture Slides (8 Kammern)	BD Falcon, Heidelberg

Dako Pen	Dako, Roskilde, Dänemark
Deckgläser 24 x 60 mm / 24 x 24 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Monovette, Li-Heparin LH / 7,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Impact 384 Tips	Thermo Scientific, Dreieich
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Lightcycler-Kapillaren (20 µl)	Roche, Mannheim
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
NuPage 7 % Tris-Acetat-Gele, 12 well	Invitrogen, Karlsruhe
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäß (0,2-2 ml)	Eppendorf, Hamburg
384-well Platten	Nunc, Wiesbaden
Whatman Papier	Biometra, Göttingen
Safety-Multifly-Set	Sarstedt, Nümbrecht
Hyperfilm™ECL	Amersham, Braunschweig
Biopsy Punch, Ø 5 mm	Stiefler, Offenbach

3.1.3 Chemikalien & Lösungen

Bezeichnung	Firma
20 % - SDS Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
6x Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Roth
Aceton	Merck, Darmstadt
Amphotericin B	Sigma, Steinheim
Cycloheximid ready made solution	Sigma, Steinheim
Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen, Karlsruhe
Diethyldicarbonat (DEPC)	Sigma, Steinheim
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
ECL	Amersham, Braunschweig
Erythrocyte lysis buffer	Qiagen, Hilden
Fetal Bovine Serum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Roskilde, Dänemark
Formaldehydlösung 37 %	Merck, Darmstadt
Hühnerserum	Sigma, Steinheim
Kaninchenserum	Sigma, Steinheim
Liberase Blendzyme 3	Roche, Penzberg

Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
NuPage Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage Tris-Acetat SDS-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin / Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
QuantiTect SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Recombinant IL-1β /IL-1F2	R&D Systems, Wiesbaden
RNAlater Solution	Sigma, Steinheim
RPMI 1640 Medium	Sigma, Steinheim
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure, HCl	Merck, Darmstadt
Spectra Multicolor Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
Tissue-Tek®	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau (0,4%)	Sigma, Steinheim
Trypsin (10x)	PAA, Pasching, Österreich
Tumornekrosefaktor (TNF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tumornekrosefaktor, TNF (human recombinant)	Sigma, Saint Louis, MO, USA
Tween 20	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim

Formaldehydlösung:

37 % Formaldehyd 1:10 verdünnt in DEPC-PBS.

Saccharoselösung:

20 % Saccharose in DEPC-PBS.

Blocklösung für Immunfluoreszenzfärbungen:

10% BSA, 10 % Ziegenserum und 10 % FCS gelöst in PBS

PBS/Triton:

0,01 % Triton-X in PBS

Zellkulturmedium

RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 0,1 % Amphotericin B

Einfriermedium

50 % Zellkulturmedium + 40 % FCS + 10% DMSO

Blocklösung für Western Blot:

5 % Magermilchpulver in TBST

TBST

6,05 g/l Tris Base

8,77 g/l NaCl

990 ml/l Aqua dest.

→ pH-Wert mit HCl auf 8,0 einstellen

10 ml/l Tween 20

Transferpuffer (=Blotpuffer)

900 ml 1x NuPage Transfer Buffer

100 ml Methanol

Strip Puffer (Western Blot)

100 ml/l 0,6 M Tris-Cl pH 6,8

30 ml/l β-Mercaptoethanol

20 ml/l SDS

3.1.4 Antikörper

Bezeichnung	Typ	Wirt	Firma
Anti-BMAL1	polyklonal	Kaninchen	Dianova, Hamburg
Anti-BMAL1	monoklonal	Maus	Abcam, Cambridge, UK
Anti-CLOCK	polyklonal	Kaninchen	Calbiochem, Darmstadt
Anti-PER1	polyklonal	Kaninchen	Millipore, Eschborn
Anti-PER2	polyklonal	Kaninchen	Biozol, Eching
Anti-CRY1	monoklonal	Maus	Novus Biologicals, Littleton CO, USA
Anti-β-Aktin	monoklonal	Maus	Sigma, Steinheim
Alexa Fluor® 546 anti-rabbit	polyklonal	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt	polyklonal	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Maus, HRP-gekoppelt	polyklonal	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.5 Kits & ELISAs

Bezeichnung	Firma
Nucleo Spin RNA II	Macherey Nagel, Düren
Nucleo Spin RNA/Protein	Macherey Nagel, Düren
Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix	Agilent Technologies, Waldbronn
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Roth
Interleukin-1 (IL-1) ELISA	IBL, Hamburg
Interleukin-6 (IL-6) ELISA	Pharmingen, Heidelberg
Interleukin-8 (IL-8) ELISA	Pharmingen, Heidelberg
TNF ELISA	IBL, Hamburg

3.1.6 Primer

Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, synthetisiert. Die 18s-Primer-Sequenzen wurden im Labor bereits verwendet und so übernommen. Die Sequenzen für alle

anderen Primer wurden über die Website der Firma anhand der cDNA der jeweiligen Gene erstellt. Alle Primer wurden so gelöst, dass sie in einer Konzentration von 100 pmol/µl vorlagen.

Primer	GC – Gehalt (in %)	Sequenz (5'->3')	Länge (in bp)
Bmal1 for	36	ATCAGACGATGAATTGAAACAC	22
Bmal1 for	45	TCATTCTGGCTGTAGTTGAGGA	22
Clock for	52	ACCCTTCCTCAACACCAAC	19
Clock rev	45	GACTGGGAATTATGGACTGAC	22
Per1 for	52	AGTTCCATTGCCTACAGCC	19
Per1 rev	50	GAAGTGCTGTCATGAGTTCC	20
Per2 for	45	GCATTTCATTAAGTGCCTCC	20
Per2 rev	55	GCTTCTCTGTGCCCTCCTTC	20
Per3 for	52	GTTGTCGCCATCGTTTGCC	21
Per3 rev	54	GCTTTGTGCCTCCCACTTTCC	22
Cry1 for	47	GGATTGATGCCATCATGACAC	21
Cry1 rev	47	CCTTCATTCCCTCTCCCAAC	21
Cry2 for	52	GCGCTGCGTTACATTCTC	19
Cry2 rev	45	CTTGTGTCAAATCTCCAGAG	22
Rev-erb α for	52,4	CCCTTCTCCTCATCTTCCTC	21
Rev-erb α rev	52,6	GATGTTGCTGGTGCTCTTG	19
CDC2 for	52	ACTGGCTGATTTGGCCTTGC	21
CDC2 rev	54	AGTTGAGTAACGAGCTGACCCC	22
18s for	55	CGGCTACCACATCCAAGGAA	20
18s rev	65	GCTGGAATTACCGCGGCTGC	20

Tab. 1: Verwendete Primer für die qPCRs mit jeweiliger Angabe des GC-Gehalts, der Basensequenz und der Anzahl der Basen.

3.1.7 Synovialgewebe

Das RA- und OA-Synovialgewebe stammte aus Operationen, die das Kniegelenk des Patienten durch eine Endoprothese ersetzten. Diese Operationen wurden im Asklepios Klinikum in 93077 Bad Abbach durchgeführt. Die Diagnosen der Patienten mit Rheumatoider

Arthritis umfassten ‚Chronische Polyarthritis‘ oder ‚Sekundäre Gonarthrose bei Rheumatoider Arthritis‘. Die Diagnose bei Osteoarrose-Patienten war ausschließlich ‚Gonarthrose‘. Die Kontrollproben wurden während einer Arthroskopie in der Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg mit Hilfe eines Biopsy Punch entnommen. Die Patienten wiesen alle ein akutes Kniestrauma auf, aber keinerlei Zeichen einer Entzündung. Alle eingeschlossenen Patienten wurden über die Verwendung des Gewebes aufgeklärt und unterschrieben eine Einverständniserklärung.

Da das Patientenmaterial in Gruppen unterschiedlicher Tageszeiten eingeordnet werden sollte, musste der Zeitpunkt der Gewebeentnahme bekannt sein. Für alle bereits vorher gesammelten Gewebe war dies jedoch nicht der Fall. Die fehlenden Daten konnten anhand der Patientenakten ermittelt werden, da darin der Zeitpunkt des ersten Schnittes während der OP verzeichnet ist. Zu dieser Zeitangabe wurden dann noch 10 Minuten hinzuaddiert.

3.2 Methoden

3.2.1 Immunofluoreszenzfärbung des Synovialgewebes

Kleine Stücke des Synovialgewebes wurden direkt in Tissue-Tek® eingebettet, langsam in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und dann bei -20 °C für einige Wochen bzw. bei -80 °C längerfristig gelagert.

Vom gleichen Patienten wurden ebenso Gewebestücke fixiert. Dazu wurde das Gewebe zunächst für 24 Stunden in einer 3,7 %-Formaldehydlösung eingelegt und anschließend weitere 24 Stunden in 20 %-Saccharoselösung in PBS fixiert. Danach wurde das Gewebe entsprechend dem Nativgewebe in Tissue-Tek® eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Das fixierte oder native Synovialgewebe in Tissue-Tek® wurde mit Hilfe des Krytotoms 5 µm dick geschnitten. Pro Patient wurden ca. 3 Schnitte von 3 verschiedenen Gewebestückchen auf einen Objektträger aufgebracht.

Die frischen Schnitte des gefrorenen Synovialgewebes trockneten eine Stunde bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurden sie mittels PBS-Puffer entweder 10 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C rehydriert.

Um zu verhindern, dass der Primärantikörper unspezifisch bindende Epitope im Gewebe erkennt, wurden solche Stellen durch die Blocklösung abgesättigt. Die Inkubationszeit betrug entweder 45 min bei RT oder erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Nach dem Blocken wurden die Schnitte in PBS 10 min gewaschen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit einem Fettstift grob umrandet und der Primärantikörper gegen das jeweilig nachzuweisende Protein aufgetragen. Die ideale Antikörperkonzentration und die Lösung, in der der Antikörper verdünnt wurde, sind vorher ausgetestet worden.

Primärantikörper	Typ	aus	Verdünnung
Anti-BMAL1	polyklonal	Kaninchen	1 : 100 in Blocklösung
Anti-CLOCK	polyklonal	Kaninchen	1 : 100 in Blocklösung
Anti-PER1	polyklonal	Kaninchen	1 : 100 in PBS mit 10%-Ziegenserum
Anti-PER2	polyklonal	Kaninchen	1 : 100 in PBS mit 10%-Ziegenserum

Tab. 2: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen des Synovialgewebes mit Angabe der Klonalität, dem Wirt, aus dem sie gewonnen wurden, und der Konzentration, in der sie eingesetzt wurden.

Nach dreistündiger Inkubation wurde überschüssiger Primärantikörper abgewaschen. Zwei Mal wurde mit PBS/Triton gewaschen und ein Mal nur mit PBS. Anschließend wurde der Sekundärantikörper Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit (Verdünnung 1:500 in der jeweiligen Lösung des Primärantikörpers) aufgetragen und für 90 min inkubiert. Danach erfolgten die gleichen Waschschrifte wie nach dem Primärantikörper.

Im nächsten Schritt wurden noch die Zellkerne mittels DAPI angefärbt. Dazu wurden die Schnitte 5 min in einer Verdünnung DAPI in PBS 1:10.000 inkubiert. Nachdem die Schnitte mit Fluorescence Mounting Medium eingedeckt worden waren, wurden sie mindestens über eine Nacht bei 4 °C aufbewahrt.

Die Färbungen von nativem und fixiertem Gewebe wurden verglichen und anschließend nur noch mit fixiertem Gewebe gearbeitet, da sich hier ein etwas besseres Ergebnis zeigte.

Pro Patient wurden die spezifisch gefärbten Zellen, sowie die Gesamtzellzahl von insgesamt 17 Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

Die Werte der jeweiligen Patienten wurden anhand der OP-Zeiten in Gruppen eingeteilt. Die Gruppen wurden in Box-Plots dargestellt und einzeln miteinander durch den t-Test auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht.

3.2.2 Blut

3.2.2.1 Expressionsprofile der Uhrengene

Für die Untersuchungen der Expression der Uhrengene in Leukozyten wurde vier freiwilligen, gesunden Probanden morgens um 8 Uhr ca. 50 ml Blut in Heparin-Röhrchen abgenommen. Je 2 ml wurden direkt verwendet und zunächst die Erythrozyten lysiert. Das Blut wurde bei 1600x g 8 min bei 4 °C zentrifugiert, anschließend das Plasma mit einer Pasteurpipette abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde resuspendiert und in ein 50 ml-Röhrchen übertragen. 21 ml Millipore-Wasser wurden dazu pipettiert und vorsichtig mit dem Blut vermischt. Durch die hypotone Umgebung platzten die Erythrozyten. Um nicht auch die etwas widerstandsfähigeren Leukozyten zu lysieren wurde nach 25 s 7 ml 3,5 %-NaCl-Lösung zugegeben und die Lösung dadurch wieder isoton. Das Gemisch wurde 10 min bei 400x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Erythrozyten-Lyse so oft wiederholt bis alle Erythrozyten entfernt und keine rote Färbung des Überstands mehr erkennbar war.

Zum Zellpellet wurden 300 µl RNAlater-Lösung gegeben und die Proben über Nacht bei 4 °C aufbewahrt und bis zur RNA-Isolation bei -30 °C gelagert.

Das restliche Blut wurde auf 6-Well-Platten verteilt. Pro Well wurde 2 ml Blut mit 1 ml Medium (RPMI 1640 inklusive FCS, Penicillin/Streptomycin, Amphotericin B) vermischt. Die Platten wurden bis zur weiteren Verarbeitung in den Brutschrank gestellt.

Alle 2 Stunden wurden die Zellen aus einem Well entnommen. Mit 3 ml PBS wurde intensiv gespült, um bereits am Boden haftende Zellen zu lösen. Anschließend wurden die Erythrozyten lysiert, 300 µl RNAlater-Lösung zum Pellet gegeben und die Zellen bei 4 °C über Nacht aufbewahrt.

Die RNA wurde mit Hilfe des NucleoSpin®-Kits isoliert. Dazu wurde zunächst die RNAlater-Lösung soweit möglich vom Pellet und anschließend die Zellen durch Zugabe von 350 µl RP1 lysiert. Das Lysat wurde auf NucleoSpin® Filtersäulen aufgetragen und durch einminütige Zentrifugation bei 11.000x g filtriert. 350 µl 70%-Ethanol wurden zum Filtrat gegeben und das Gemisch homogenisiert. Die Lösung wurde nun auf die NucleoSpin®RNA / Protein-Säule aufgetragen. Danach wurde 30 s bei 11.000x g zentrifugiert, um die RNA an die Silicamembran der Säule zu binden. Die Säule mit der gebundenen RNA wurde mit 350 µl MDB (membrane desalting buffer) 1 min bei 11000x g gewaschen, um vorhandenes Salz zu entfernen, das sich negativ auf den folgenden DNA-Verdau hätte auswirken können. Mit 95 µl 30 %iger-DNAse I-Lösung wurde innerhalb von 10 min bei Raumtemperatur die auf der Membran befindliche DNA verdaut. Danach wurde die Silicamembran dreimal bei je 11.000x g gewaschen: Zuerst mit 200 µl RA2-Puffer und anschließend mit 600 µl RA3 je 30 s. Das dritte Mal wurde mit 250 µl RA3 2 min gewaschen. Dann wurde die RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser bei 11.000x g 1 min lang eluiert.

Die RNA wurde vorübergehend bei -30 °C aufbewahrt, längerfristig bei -80 °C.

Die gewonnene RNA wurde mittels *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* in complementary-DNA (auch copy-DNA; cDNA) umgeschrieben.

Dazu wurden jeweils 11 µl RNA zusammen mit 1 µl Random Hexamer-Primer, 5 µl Reaction buffer, 1 µl Ribonuclease inhibitor (20 U/µl), 2 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl RevertAid™H Minus M-MuLV RT (200 U/µl) gemischt und zunächst 5 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wird bei 42 °C für eine Stunde die RNA in cDNA im Verhältnis 1:1 umgeschrieben. Die Reaktion wird anschließend durch 5 min bei 70 °C gestoppt.

Die so synthetisierte cDNA konnte nun als Matrize für die qPCR (quantitative polymerase chain reaction) eingesetzt werden.

Die qPCR wurde mit dem Light Cycler II durchgeführt. In jedem qPCR-Lauf wurde eine Standardkurve für das jeweilige Gen erstellt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt mit 50 ng, 5ng, 0,5 ng Gesamt-RNA zuzüglich einer Negativkontrolle ohne RNA. Die RNA wurde aus MH7A-Zellen gewonnen und für alle Standardkurven verwendet. Sowohl für die Standardkurve als auch für alle anderen Proben wurde eine Doppelbestimmung

durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte noch anhand ihrer Schmelzkurven überprüft.

Einfacher Ansatz (20 µl):

7 µl Wasser (RNase frei)
1 µl Primer froward
1 µl Primer reverse
10 µl SYBR Green Mastermix
1 µl cDNA

qPCR-Programm:

94 °C	10 min	DNA-Denaturierung
94 °C	30 s	DNA-Denaturierung
52 °C	1 min	Primeranlagerung
72 °C	1 min	Verlängerung des DNA-Strangs
72 °C	10 min	Fertigstellen der DNA-Stränge

→ 41 Zyklen

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der LightCycler Software (Version 3.5). Anhand der Standardkurve konnte den jeweiligen Proben ein Wert zugewiesen werden. Der Wert zum Zeitpunkt 0 (= 8 Uhr morgens) wurde gleich 1 gesetzt und alle anderen Werte in Relation dazu berechnet.

3.2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung der Leukozyten

Das Blut stammte von gesunden Freiwilligen. Für die erste Untersuchung wurden einer Probandin (27 Jahre) alle 4 Stunden über 24 Stunden hinweg ca. 7 ml Blut in ein Heparin-Röhrchen abgenommen. Die zweite Untersuchung umfasste vier Probanden denen über einen Zeitraum von 12 Stunden wiederum alle 4 Stunden 7 ml Blut abgenommen wurde. Zu jedem Zeitpunkt wurden die Erythrozyten wie bereits beschrieben lysiert. Das Zellpellet bestehend aus Leukozyten wurde in 5 ml PBS resuspendiert.

Zur Quantifizierung der Zellen wurden etwas Zellsuspension und Trypanblau im Verhältnis 1:1 vermischt und damit eine Zählkammer befüllt. Es wurden vier Großquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt und die Zellzahl pro ml berechnet.

(gezählte Zellen) : 4 x 10.000 x 2 = Zellzahl pro ml Zellsuspension

Pro Objekträger wurden je zwei Spots mit Hilfe eines Fettstiftes begrenzt und je Spot 40.000 Zellen aufgetragen. Nach 45 min bei 4 °C wurde die restliche Flüssigkeit vorsichtig abgeklopft und die sedimentierten Zellen fixiert.

Zur Fixierung wurden unterschiedliche Methoden ausgetestet und verglichen. Durch Aceton-Methanol-Gemische in unterschiedlichen Verhältnissen kam es immer zur Zerstörung der Zellen. Nur durch die Fixierung mit 3,7 % Formaldehydlösung blieben die Zellen in ihrer Form erhalten.

Die Objekträger wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden nach demselben Protokoll durchgeführt wie die des Synovialgewebes.

3.2.3 Fibroblasten

3.2.3.1 Ziellinie MH7A

Die Zelllinie MH7A wurde über die Riken-Zellbank, Japan erworben. Die dazu benötigte Einverständniserklärung des Depositors, Kissei Pharmaceutical Co., Ltd., Japan, wurde eingeholt. Diese Zelllinie entstand durch die Immortalisierung synovialer Fibroblasten einer japanischen RA-Patientin mittels SV 40 T-Antigen. (78)

Kultiviert wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,1 % Amphotericin B und alle 2-3 Tage gesplittet.

3.2.3.2 Primäre synoviale Fibroblasten

Das frische Gewebe wurde mit dem Skalpell in so kleine Stücke wie möglich geschnitten. Mit Hilfe des Enzyms Liberase in PBS (0,28 units/ml) wurde die extrazelluläre Matrix eine Stunde bei 37°C und unter starkem Schütteln verdaut. Dabei wurden die Synoviozyten aus dem Gewebe gelöst und vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen bei 460x g und 4 °C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen durch ein 70 µm-grobes Sieb von noch übrigen Gewebefragmenten abgetrennt. Dieses Gewebe wurde nochmals mit Liberase für eine weitere Stunde verdaut. Die hieraus gewonnenen gemischten Synoviozyten wurden mit den ersten vereinigt und anschließend in Zellkulturflaschen mit RPMI 1640 Medium, inklusive FCS, Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B ausgesät.

Nach ca. 1-2 Passagierungen sterben ursprünglich enthaltene Makrophagen bereits ab und man hat eine reine Fibroblastenpopulation vorliegen.

3.2.3.3 Kontrollfibroblasten

Das Gewebe wurde behandelt wie das Synovialgewebe von OA- und RA-Patienten. Jedoch war hier nur ein einmaliger Verdau mit Liberase für eine Stunde nötig, da das Gewebestückchen hier sehr klein war. Nach dem Verdau wurden die Zellen und Gewebereste abzentrifugiert (10 min bei 460x g), der Überstand abgenommen, die Zellen noch ein Mal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert und anschließend in RPMI 1640-Medium inklusive FCS, Penicillin/Streptomycin, Amphotericin B aufgenommen und in eine kleine Zellkulturflasche überführt.

3.2.4 Ablauf der 36-und 72-Stunden-Experimente

In 6-well-Platten wurden 150.000 Zellen pro well ausgesät, das Volumen mit RPMI 1640-Medium inklusive FCS, Penicillin/Streptomycin, Amphotericin B auf 3 ml aufgefüllt, und die Zellen konnten so für ca. 48 Stunden wachsen. Anschließend wurden sie synchronisiert, indem sie zwei Tage ohne FCS kultiviert wurden. Zum Zeitpunkt 0 wurde dieses Medium durch normales Kulturmedium inklusive 10 % FCS ersetzt. Bei den Stimulationsversuchen mit IL-1 β bzw. TNF wurde noch zusätzlich 1 ng Zytokin pro ml zum Medium dazugegeben. Um die Proben über einen 72-Stunden-Zeitraum bearbeiten zu können, wurden ein Teil der Zellen 36 Stunden vor den anderen jeweils ausgesät und behandelt. So war es möglich die bis zu 72 Stunden stimulierten Zellen in einem Zeitraum von 36 Stunden zu ernten. Zum Zeitpunkt 0 wurden die ersten Zellen geerntet, nach 2 weiteren Stunden konnten die Zellen der entsprechenden Zeitpunkte 2 Stunden und 38 Stunden geerntet werden. (Abb. 5)

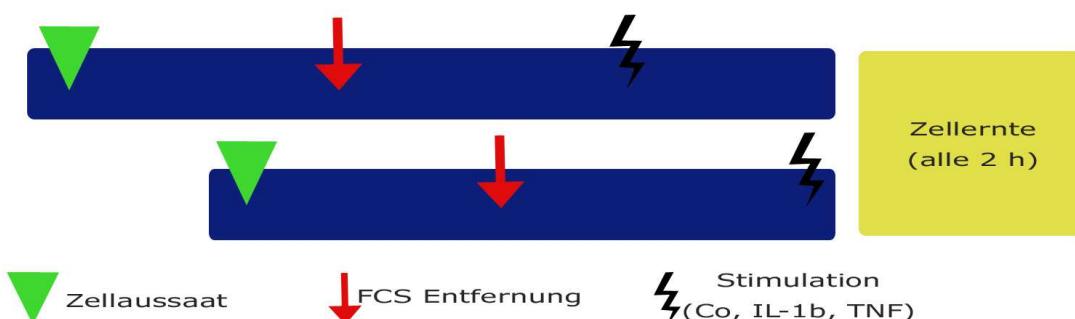


Abb. 5: Schematischer Ablauf der 72-Stunden-Experimente

Ab dem Zeitpunkt 0 wurden alle zwei Stunden ein Well pro Patient / Zelllinie und Bedingung geerntet. 220 µl des Zellüberstands wurden für die spätere Bestimmung von IL-6, IL-8, TNF oder IL-1β weggefroren. Der restliche Überstand wurde verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin vom Untergrund gelöst. Mit 1 ml FCS-haltigem Medium wurde die Trypsinierung gestoppt und die Zellsuspension in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden anschließend für 8 min bei 460x g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und 300 µl RNAlater Solution zugegeben. Die Zellen wurden zunächst für einen Tag bei 4 °C aufbewahrt und anschließend bei -30 °C bis zur RNA-Isolation gelagert.

Die RNA-Isolation und die anschließende cDNA-Synthese wurden genauso durchgeführt, wie es bereits im Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben wurde.

Die qPCR wurde ab jetzt mit dem TaqMan durchgeführt um die große Anzahl von Proben bewältigen zu können. Im Gegensatz zum Light Cycler II-System können hier anstelle von 36 Proben 384 bearbeitet werden. Es wurde nun auch keine Standardkurve mehr verwendet, sondern nur eine Probe als Kalibrator eingesetzt, auf die die anderen Werte bezogen wurden. Pro untersuchtem Gen wurde zu jedem Zeitpunkt eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

<u>Einfacher Ansatz (10 µl):</u>	3 µl Wasser (RNase-frei)
	0,5 µl Primer froward
	0,5 µl Primer reverse
	5 µl Brilliant II SYBR Green qPCR Mastermix
	1 µl cDNA

qPCR-Programm:

94 °C	10 min	DNA-Denaturierung
94 °C	30 s	DNA-Denaturierung
52 °C	1 min	Primeranlagerung
72 °C	1 min	Verlängerung des DNA-Strangs
72 °C	10 min	Fertigstellen der DNA-Stränge

Die Ergebnisse der qPCR wurden mit Hilfe der SDS 2.3 Software von Applied Biosystems ausgewertet. Der Grenzwert wurde so gewählt, dass er innerhalb der exponentiellen Phase der Amplifikation lag. Der Punkt an dem eine Probe diesen Wert überschritt, ist der Ct (*cycle threshold*).

Zum Zeitpunkt 0 wurden zwischen zwei und fünf Proben pro Zelllinie bzw. Patient geerntet, und jede Probe durchlief einzeln die Schritte von RNA-Isolation bis qPCR. Die erhaltenen Cts aller Proben wurden anschließend pro Gen gemittelt und als Ausgangswert für alle Bedingungen (Co, IL-1 β , TNF) verwendet.

Sonst wurde pro Zeitpunkt und Bedingung nur ein Well verwendet. Die erhaltenen drei Ct-Werte der jeweiligen Gene wurden ebenfalls gemittelt und der Ct-Wert von 18s, dem Haushaltsgen als interne Kontrolle, zum Zeitpunkt 0 wurde davon jeweils subtrahiert. Die Auswertung erfolgte anhand der $\Delta\Delta Ct$ -Methode. (79)

Pro Gen wurden alle so erhaltenen Werte durch den Wert des jeweiligen Gens zum Zeitpunkt 0 geteilt. Somit entspricht der Wert für t=0 immer 1 und alle weiteren Werte der Kinetik wurden in Relation dazu ausgedrückt.

Die einzelnen Werte der relativen Veränderungen der mRNA-Mengen im Vergleich zum Zeitpunkt 0 wurden für die Kontrollbedingung (ohne Zytokin Zugabe) pro Gen und Patient bzw. Zelllinie über den Untersuchungszeitraum gemittelt. Alle Werte der erhaltenen mRNA-Mengen-Änderungen wurden pro Bedingung anschließend prozentual zu diesem Mittelwert ausgedrückt. Diese Prozentwerte wiederum wurden zu einem Box Plot zusammengefasst und einzeln miteinander durch den Mann-Whitney Rank Sum Test auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht.

3.2.5 Stabilität von IL-1 β und TNF unter Zellkulturbedingungen

Anhand der gesammelten Zellkulturüberstände von vier verschiedenen Patienten wurde mittels ELISA die Stabilität der Zytokine unter Zellkulturbedingungen ermittelt. IL-1 β ist dabei wesentlich stabiler als TNF. TNF ist bereits nach 4 Stunden nur noch in halber Konzentration nachweisbar. Die Konzentration von IL-1 β dagegen hat sich erst nach 72 Stunden halbiert. (Abb. 6)

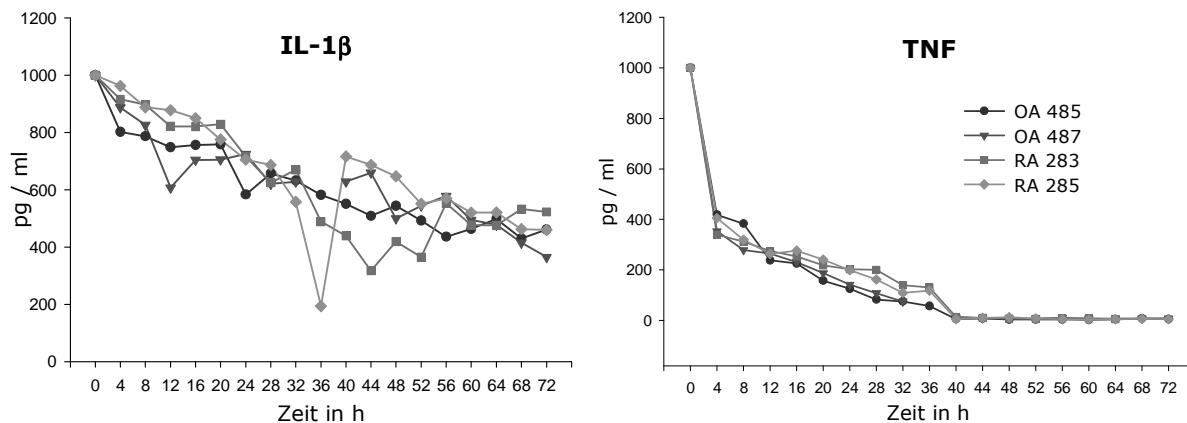


Abb. 6: Stabilität von IL-1 β und TNF in Zellkultur. Die Hälfte des ursprünglich 1 ng/ml eingesetzten IL-1 β ist nach 72 Stunden immer noch nachweisbar. TNF dagegen weist eine wesentlich geringere Stabilität auf. Hier hat sich die detektierbare Menge bereits nach 4 Stunden in Kultur halbiert. Nach 40 Stunden unterschritt TNF die Detektionsgrenze.

3.2.5 Etablierung der Western Blots für BMAL1, CLOCK und PER1

Für zukünftige Untersuchungen der zirkadianen Rhythmus synovialer Fibroblasten wurden begonnen, die Western Blots für BMAL1, CLOCK und PER1 zu etablieren.

Die Proteine wurden mit dem Nucleo Spin RNA/Protein-Kit aus MH7A-Zellen entsprechend des Herstellerprotokolls isoliert.

Durch die Zugabe von 350 μ l RP1 wurden die Zellen lysiert. Das Lysat wurde gemischt, anschließend auf die NucleoSpin® Filtersäulen aufgetragen und durch Zentrifugation bei 11.000x g 1 min filtriert. 350 μ l 70%-Ethanol wurden zum Lysat gegeben und das Gemisch homogenisiert. Die Lösung wurde nun auf die NucleoSpin® RNA / Protein-Säule aufgetragen und 30 s bei 11.000x g zentrifugiert. Die Proteine befanden sich dann im Durchfluss und wurden durch Zugabe von Protein Precipitator im Verhältnis 1:1 ausgefällt. Anschließend wurde 5 min bei 11000x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Mit 500 μ l 50 %-Ethanol wurde das Pellet gewaschen und erneut bei 11000x g 1 min zentrifugiert. Das Pellet wurde komplett vom Ethanol befreit und danach für ca. 10 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Dazu wurden 100 μ l PLB (protein loading buffer) pipettiert, das Pellet zerkleinert und die Suspension 3 min bei 95 °C aufgekocht. Hierbei wurden die Proteine denaturiert und gingen in Lösung. Nach dem Abkühlen auf RT wurde die Lösung bei -20 °C gelagert.

Die Konzentration der Proteinlösung wurde mit Hilfe des NanoDrops bestimmt, und das Protein in die Taschen eines 7 %-Tris-Acetat-Gels aufgetragen. Es wurden Proteinmengen von 10 μ g, 20 μ g, 30, μ g, 40 μ g und 60 μ g eingesetzt. Die Proteingemische wurden nun

eine Stunde lang bei anfangs 120 mA und konstanten 200 V aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (2 Stunden bei 30 V und 170 mA). Die Membran wurde nun für mindestens 30 min in TBST-Puffer mit 5 % gelöstem Magermilchpulver geblockt. Hierbei wurden alle freien Stellen der Membran mit Milcheiweiß abgedeckt, um unspezifische Bindung des Primärantikörpers an die Nitrocellulose zu verhindern. Der jeweilige Primärantikörper gegen BMAL1, CLOCK und PER1 wurde in der Blocklösung verdünnt und die Membran darin über Nacht bei 4 °C inkubiert. Bei der Verwendung des Anti-β-Aktin-Antikörpers wurde nur 3 h inkubiert. Danach wurde drei Mal 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und der jeweilige Sekundärantikörper für 1-2 Stunden auf die Membran gegeben. An diesen Sekundärantikörper war das Enzym HRP (horse radish peroxidase; Meerrettichperoxidase) gekoppelt. Nachdem erneut fünf Mal 5 min mit TBST-Puffer gewaschen worden war, wurde die ECL-Lösung als Substrat für die HRP dazugegeben. Durch den Umsatz des Substrats entstand Electrohemilumineszenz, die einen ECL-Hyperfilm belichtete, wodurch die Banden des nachzuweisenden Proteins sichtbar wurden.

Sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper können mittels Strippuffer wieder von dem Protein abgewaschen werden. Dies ermöglichte den Nachweis verschiedener Proteine auf einer einzigen Membran.

Primärantikörper	Typ	aus	Verdünnung (in Blocklösung)
Anti-BMAL1	monoklonal	Maus	1 : 100
Anti-BMAL1	polyklonal	Kaninchen	1 : 100
Anti-CLOCK	polyklonal	Kaninchen	1 : 100
Anti-PER1	polyklonal	Kaninchen	1 : 100
Anti-β-Aktin	monoklonal	Maus	1 : 10.000

Tab. 3: Für das Western Blotting verwendete Primärantikörper

Sekundärantikörper	Typ	aus	Verdünnung (in Blocklösung)
Anti-Maus (HRP)	polyklonal	Ziege	1 : 2000
Anti-Kaninchen (HRP)	polyklonal	Ziege	1 : 2000

Tab. 4: Für das Western Blotting verwendete Sekundärantikörper

4 Ergebnisse

4.1 Uhrenproteine im Synovialgewebe

4.1.1 BMAL1, CLOCK, PER1 und PER2 sind im Synovialgewebe vorhanden

Die vier Komponenten der molekularen Uhr BMAL1, CLOCK, PER1 und PER2 konnten im Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Auch in nichtentzündlichen Traumakontrollen waren sie detektierbar (Abb. 7).

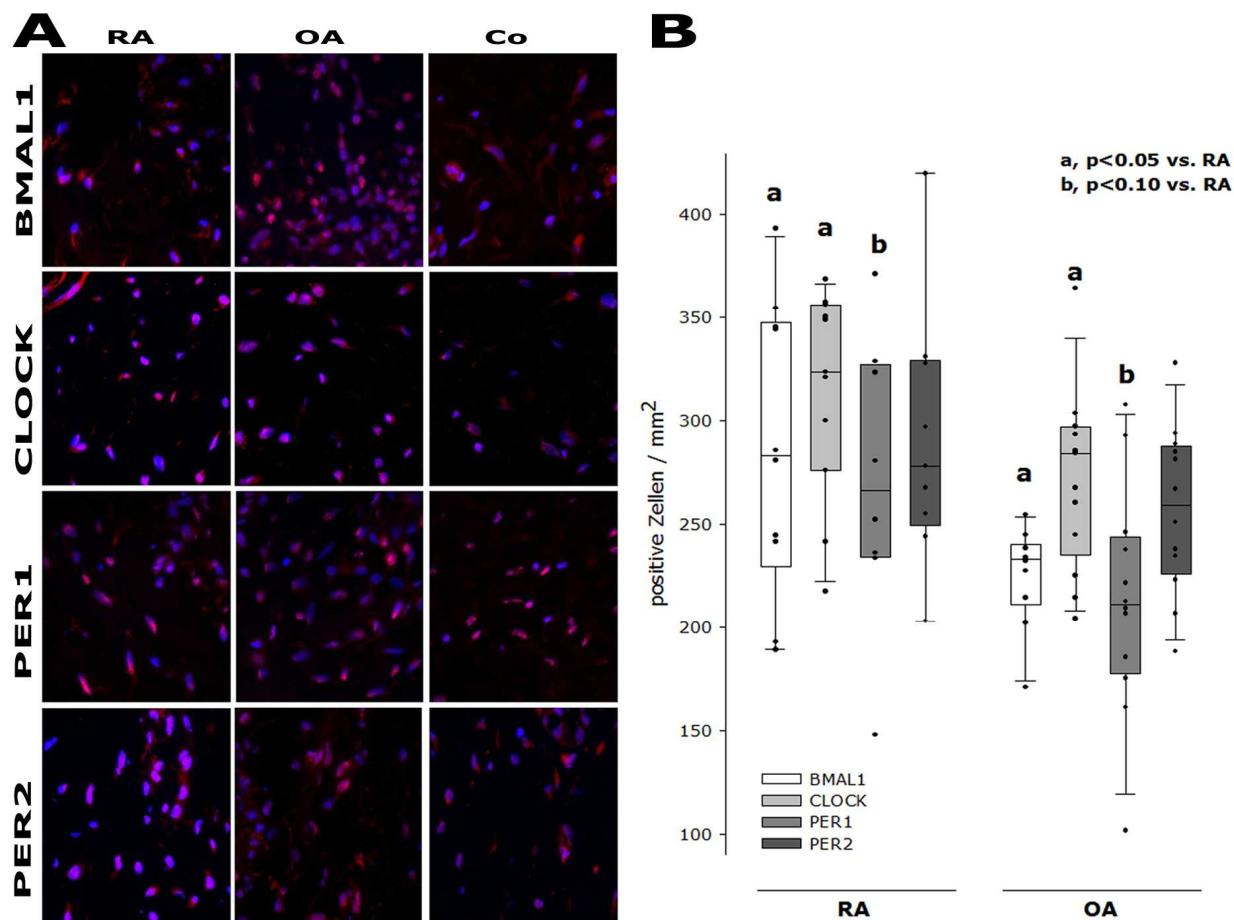


Abb. 7: (A) Nachweis der Uhrenproteine BMAL1, CLOCK, PER1 und PER2 (jeweils rot; Zellkerne blau) im Synovialgewebe von RA-, OA- und Traumapatienten. (B) Die anfänglichen Auszählungen der positiven Zellen im Synovialgewebe ergaben den größten Unterschied zwischen RA- und OA-Patienten in Bezug auf BMAL1, weshalb dieses als Kandidatenprotein für weitere Untersuchungen ausgewählt wurde.

Die Anzahl BMAL1-, CLOCK-, PER1- und PER2-positiver Zellen pro mm^2 wurde im Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten ausgezählt und verglichen. Da sich hier die

ausgeprägtesten Unterschiede für BMAL1 ergaben, wurde dieses zunächst als Kandidatenprotein ausgewählt.

4.1.2 BMAL1 und PER1 zeigen keine Oszillationen im Synovialgewebe

Neben den RA- und OA-Patienten wurden nun auch nichtentzündliche Traumakontrollen miteinbezogen. Des Weiteren wurde die Anzahl BMAL1-positiver Zellen in Bezug zur Gesamtzellzahl gesetzt und die Patienten in vier Gruppen entsprechend der Zeitpunkte ihrer Operation eingeteilt.

Der Anteil BMAL1-positiver Zellen unterscheidet sich nur im Zeitraum zwischen 7 und 10 Uhr morgens in RA- und OA-Patienten signifikant von den Traumakontrollen (Abb. 8). Sowohl im RA- als auch im OA-Synovialgewebe ist hier die Zahl BMAL1-positiver Zellen höher als in dem nichtentzündlichen Gewebe. Für alle restlichen Zeiträume ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen. Innerhalb dieser Patientengruppen war ebenfalls keine Änderung des Prozentsatzes BMAL1-positiver Zellen zwischen den Zeitpunkten und somit auch keine Oszillation des Uhrenproteins feststellbar. Um auszuschließen, dass es eventuell nur für BMAL1 zu keiner Schwingung im Synovialgewebe kommt, wurde außerdem noch der Anteil PER1-positiver Zellen für alle drei Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten ausgezählt.

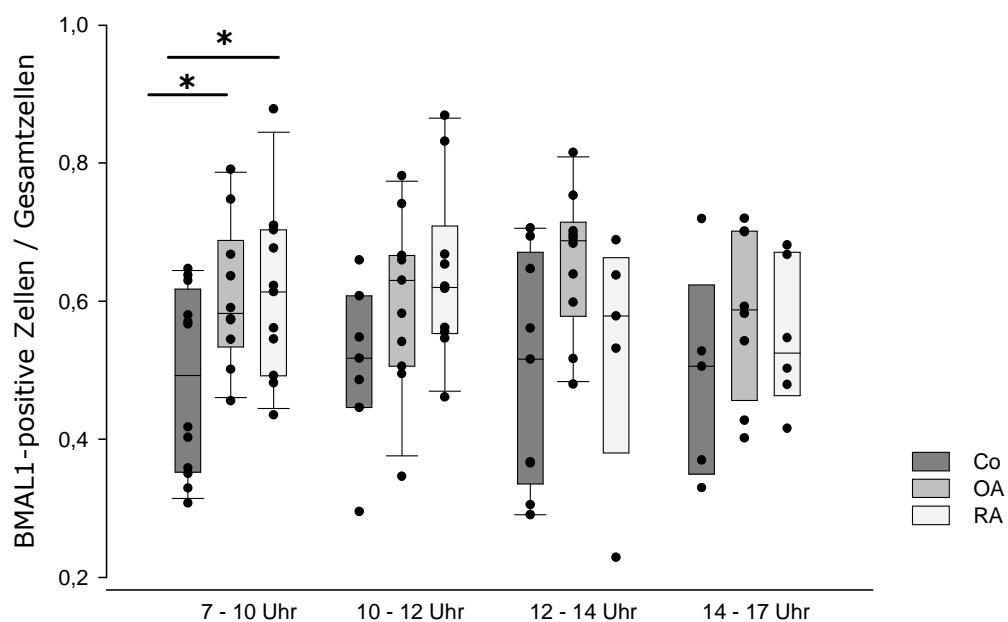


Abb. 8: Der Anteil BMAL1-positiver Zellen im Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten und Traumakontrollen wurden mittels Immunfluoreszenz ermittelt und nach Zeit der stattgefundenen OP gruppiert. Die einzelnen Gruppen wurden mit dem t-Test auf Unterschiede hin überprüft. (* $\Delta p < 0,05$)

Für PER1 ergab sich ein ähnliches Bild wie für BMAL1. Auch hier war der Prozentsatz PER1-positiver Zellen relativ ähnlich zwischen RA, OA und Kontrolle und auch hier waren keinerlei Veränderungen im Tagesverlauf feststellbar (Abb. 9).

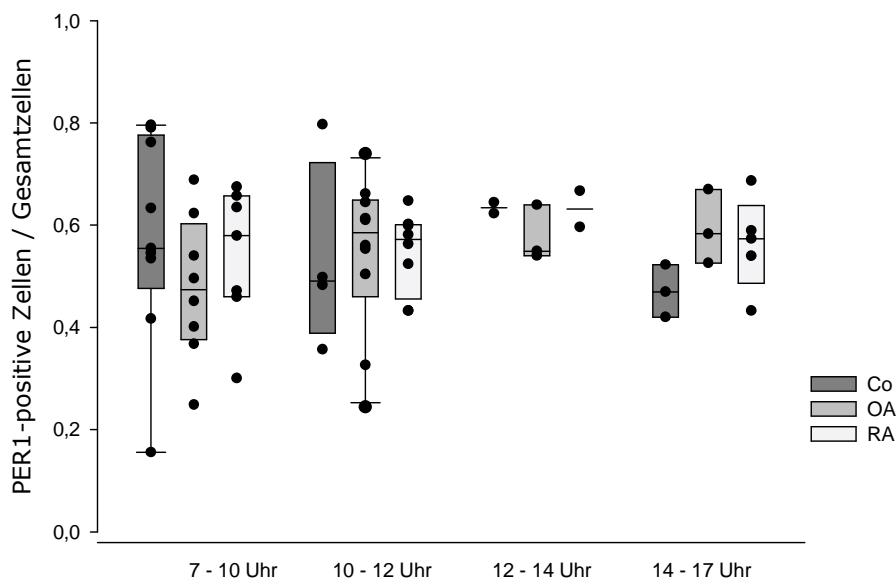


Abb. 9: Anteil PER1-positiver Zellen im Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten und Traumakontrollen gruppiert nach Zeitpunkt der OP. Die Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz angefärbt, ausgezählt und mit dem t-Test auf mögliche Unterschiede hin überprüft.

4.2 Uhrenproteine im Blut

Synovialgewebe hat den großen Nachteil, dass es nur begrenzt verfügbar ist. Vor allem für Gewebe aus RA-Patienten und Traumakontrollen stellte dies ein erhebliches Problem dar. Aufgrund der regulären OP-Zeiten war es außerdem unmöglich einen Zeitraum von 24 Stunden abzudecken, weshalb kein kompletter Zyklus des zirkadianen Rhythmus untersucht werden konnte. Blut dagegen ist einfach zugängliches humanes Material, bei dessen Entnahme dem Probanden kaum Schaden zugefügt wird, und welches über einen längeren Zeitraum immer wieder in kleinen Mengen entnommen werden kann.

Wir wollten nun zunächst die Rhythmus von Blutzellen von gesunden Personen untersuchen, und diese anschließend mit der von RA- und OA-Patienten vergleichen. Blut könnte so vielleicht als diagnostisches Mittel verwendet werden, um einen gestörten zirkadianen Rhythmus im RA-Patienten unkompliziert nachzuweisen.

4.2.1 Unterschiedliche Expressionsprofile der Uhrengene in Normalpersonen

Die mRNA-Profile der Uhrengene *Bmal1*, *Clock*, *Per1* und *Per2* wurden von vier Probanden erstellt. Bei zwei der Probanden wurde wie erwartet ein antiphasischer Anstieg von *Bmal1* und *Per1* bzw. *Per2* innerhalb des 24-stündigen Untersuchungszeitraums festgestellt (Abb. 10). Das bestätigt die Annahme, dass durch Zunahme des positiven Regulators auch mehr negative Regulatoren (*Pers*, *Crys*) gebildet werden, die wiederum ihre eigene Expression hemmen und zusätzlich, im Fall von *Per2*, die Transkription von *Bmal1* induzieren. Überraschenderweise wurde aber in den beiden anderen Probanden ein gleichzeitiger Anstieg von *Bmal1* und *Per1* beobachtet (Abb. 10).

Man konnte also zwei Arten von Chronotypen unterscheiden (Abb. 10). Typ I mit antiphasischen Schwingungen von *Bmal1* und *Per1* und Typ II, bei dem die mRNAs dieser zwei Uhrengene in Phase schwangen. Bei der Gegenüberstellung der beiden Chronotypen wurde deutlich, dass sich die Unterschiede in erster Linie nur für diese zwei Uhrengene manifestierten. Chronotyp I zeigte für *Bmal1* generell kaum Veränderungen der mRNA über 24 Stunden hinweg. Bei Chronotyp II dagegen zeigten sich hier deutliche Schwankungen im Tagesverlauf.

Per1 oszillierte in beiden Chronotypen (Abb. 10). Dessen mRNA-Menge erreichte im Chronotyp I um 14 Uhr einen Maximalwert, nahm anschließend bis 22 Uhr ab, um danach wieder kontinuierlich anzusteigen. Bei Chronotyp II wurde dagegen erst um 20 Uhr am meisten *Per1* in den Zellen gefunden. Das Expressionsmuster von *Per1* war in den beiden Chronotypen somit genau gegensätzlich.

Clock unterlag in beiden Chronotypen keinen größeren Schwankungen (Abb. 10). Nur gegen 6 Uhr morgens kam es bei Chronotyp I zu einem kurzen Anstieg.

Die Verlaufskurven von *Per2* ähnelten sich in beiden Typen und folgten jeweils einem perfekten 24 Stunden-Rhythmus. Um 10 Uhr morgens wurde der Maximalwert erreicht, der Nadir exakt 12 Stunden später (Abb. 10).

Aufgrund dieser starken interindividuellen Schwankungen der mRNA-Mengen eignet sich das Expressionsprofil der Uhrengene nicht als Referenzsystem, um Normalpersonen und RA- bzw. OA-Patienten zu vergleichen.

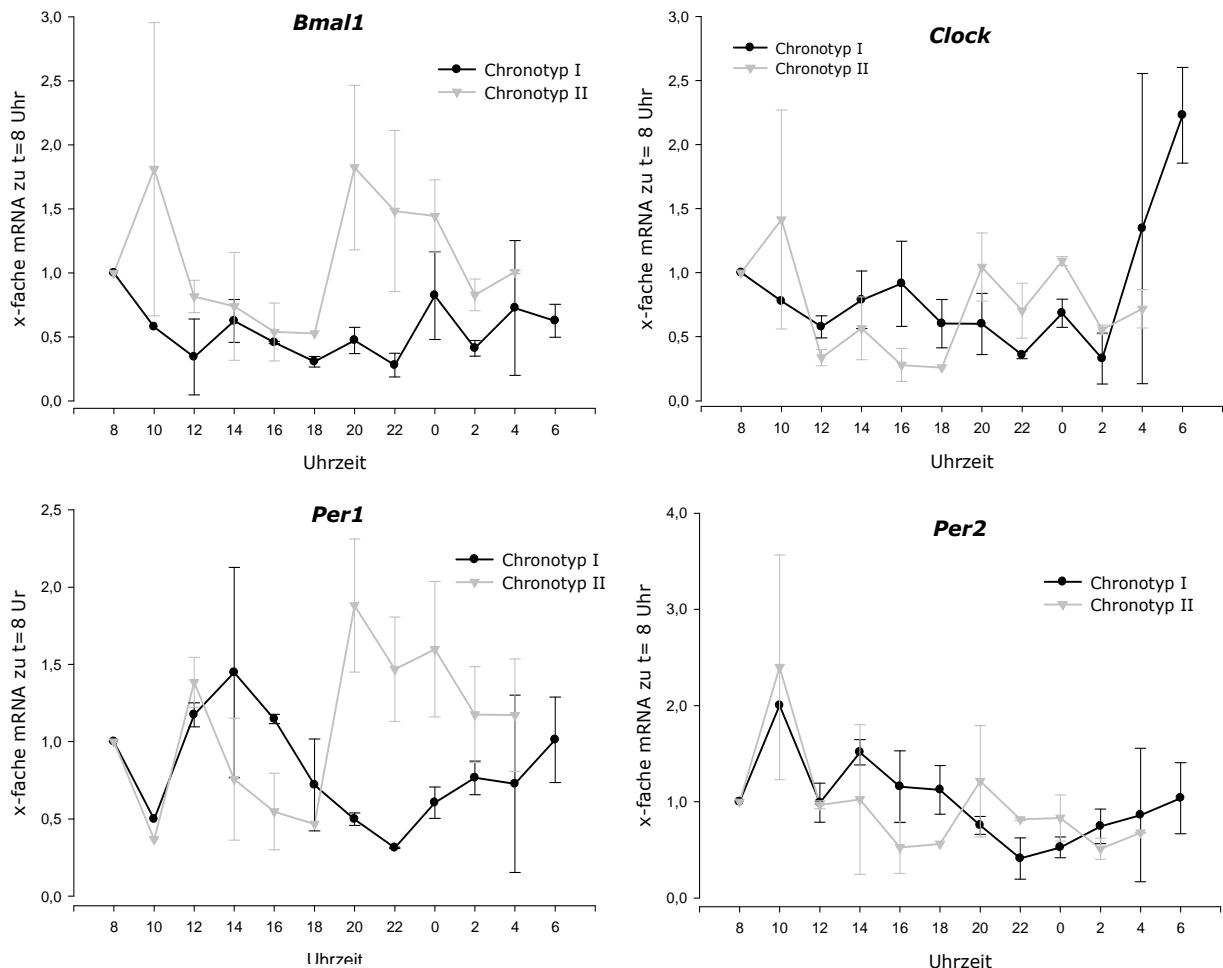


Abb. 10: Die Expressionsprofile der Uhrengene im Blut von Normalpersonen ließen zwei grundsätzlich unterschiedliche Chronotypen erkennen.

4.2.2 Blutzellen zeigen keine Synchronizität

Im nächsten Schritt sollte die zirkadiane Rhythmusik der Blutzellen auf Proteinebene ermittelt werden, da Schwankungen auf mRNA-Ebene nicht zwangsläufig Oszillationen der Proteine widerspiegeln müssen.

In ersten Experimenten wurde hierfür einer Probandin (27 Jahre) alle vier Stunden über 24 Stunden hinweg Blut abgenommen, daraus die Leukozyten isoliert und auf die vier Uhrenproteine BMAL1, CLOCK, PER1 und PER2 angefärbt. Die Zellen wurden anschließend auf Basis ihrer Morphologie in drei Gruppen unterteilt (Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten).

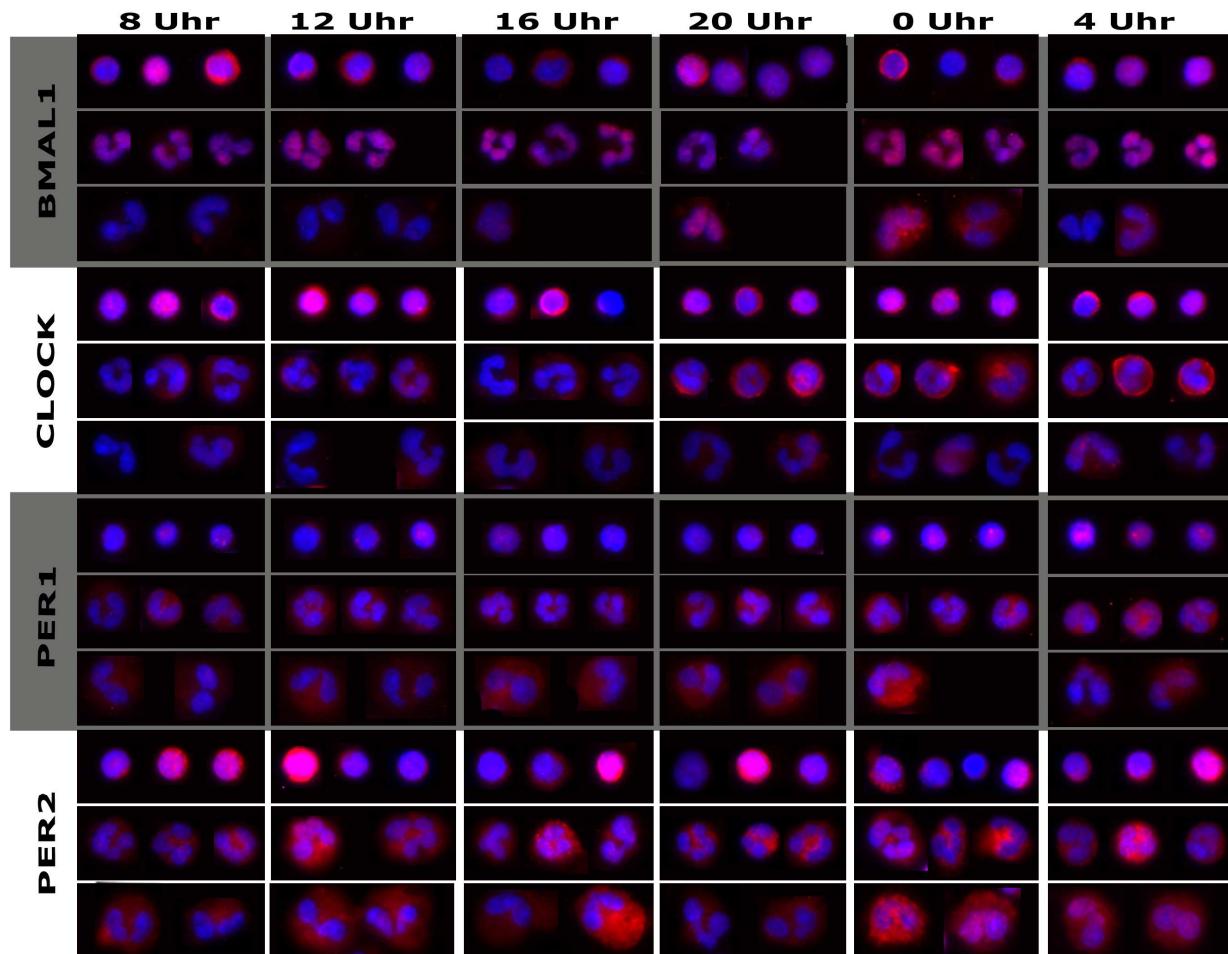


Abb. 11: Blutzellen einer gesunden Probandin, der über 24 Stunden hinweg alle 4 Stunden Blut abgenommen wurde. Die Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz angefärbt auf die Uhrenkomponenten BMAL1, CLOCK, PER1 und PER2 (jeweils rot; Zellkerne blau) und makroskopisch in drei Gruppen unterteilt: Lymphozyten (jeweils erste Reihe), Granulozyten (jeweils zweite Reihe) und Monozyten (jeweils dritte Reihe).

Obwohl hier nun ein vollständiger Zyklus von 24 Stunden abgedeckt wurde, zeigte sich keine Synchronizität der verschiedenen Blutzellen. So waren die einzelnen Uhrenproteine nicht einheitlich in einem Zelltyp pro Zeitpunkt vorhanden bzw. lokalisiert. Es konnten z.B. um 8 Uhr morgens Lymphozyten gefunden werden, die sowohl im Kern als auch im Zytoplasma eine BMAL1-Färbung aufwiesen. Gleichzeitig aber auch solche die entweder im Kern oder im Zytoplasma BMAL1-positiv waren. Für CLOCK war über den gesamten Zeitraum keine Färbung der Monozyten feststellbar. Die Granulozyten zeigten für CLOCK eine ausschließlich zytoplasmatische Färbung. PER1 wurde nur im Zellkern der Lymphozyten detektiert, wogegen es bei den Granulozyten und Monozyten nur zytoplasmatisch vorhanden war. PER2 war in allen drei Zellgruppen in beiden Zellkompartimenten nachweisbar. (Abb. 11)

Letztendlich war für keines der vier Uhrenproteine und für keine bestimmte Gruppe von Zelltypen ein eindeutiger Verlauf, wie z.B. eine Zunahme des nachzuweisenden Proteins im Zellkern oder die Translokation des Proteins aus dem Zytoplasma in den Kern, eindeutig nachweisbar.

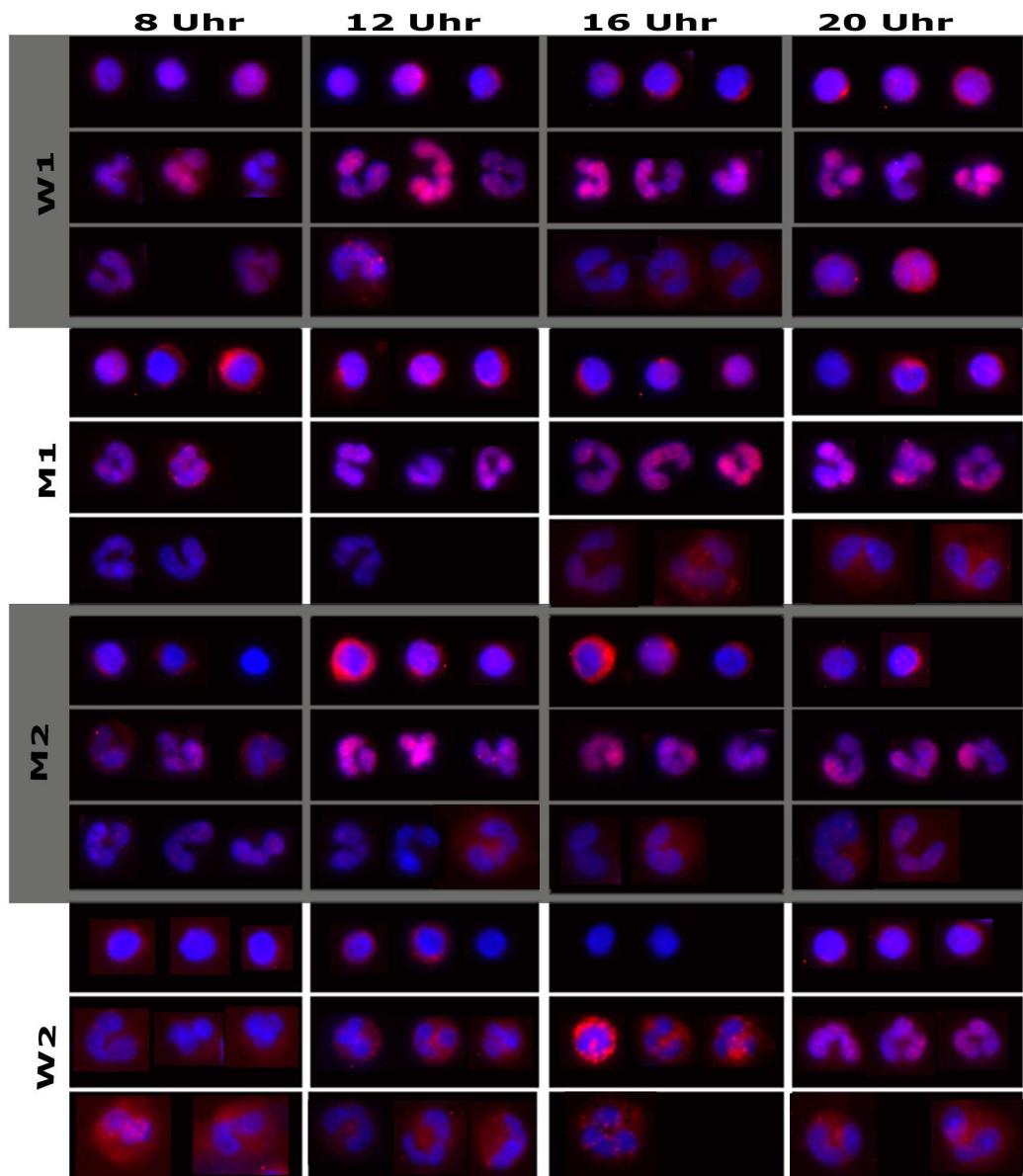


Abb. 12: Blutzellen von zwei weiblichen (W1, W2) und zwei männlichen Probanden (M1, M2) mit BMAL1-Färbung (rot; Zellkerne blau) über einen Zeitraum von 12 Stunden. Es zeigte sich keine Synchronizität innerhalb einer Zellpopulation (Lymphozyten jeweils erste, Granulozyten jeweils zweite und Monozyten jeweils dritte Reihe). Des Weiteren ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den jeweiligen Probanden.

Da es sich hierbei um ein Einzelphänomen handeln könnte, wurde der Versuch mit derselben Probandin und drei weiteren Probanden (eine Frau, zwei Männer) wiederholt. Die Ursache der fehlenden Synchronizität des ersten Experiments könnte durch Schlafmangel oder

andere äußere Einflüsse bedingt sein. Auch die natürlichen hormonellen Schwankungen innerhalb des weiblichen Zyklus könnten eine große Wirkung auf den zirkadianen Rhythmus von Blutzellen ausüben. Deshalb wurden zusätzlich zwei männliche Probanden mit in die Untersuchung eingeschlossen. Der Zeitraum umfasste diesmal nur 12 Stunden, innerhalb derer sich Schwankungen auf Proteinebene aber bereits manifestieren müssten. Außerdem wurden die Zellen nur auf BMAL1 angefärbt, was aber auch ausreichen sollte, um mögliche Tendenzen der einzelnen Probanden festzustellen.

Bei diesem Experiment ergab sich ein ähnliches Bild wie bei der ersten Probandin. Es zeigte sich für keine Zellpopulation eine Synchronizität (Abb. 12).

Die unterschiedlichen Expressionsmuster der Blutzellen pro Zeitpunkt und Zelltyp und die Tatsache, dass die Synovialmembran bei OA- und RA-Patienten von einer Vielzahl von Lymphozyten und Monozyten infiltriert wird, könnte erklären weshalb keine Rhythmisierung der Uhrenproteine im Synovialgewebe feststellbar war. Um den maskierenden Effekt verschiedener Zellpopulationen ausschließen zu können, wurden die folgenden Untersuchungen nur noch an synovialen Fibroblasten durchgeführt. Neben den synovialen Makrophagen stellen sie die zweite Gruppe der Synoviozyten dar. Sie tragen entscheidend zur Pathogenese der RA bei und sind zudem auch, im Gegensatz zu Makrophagen, relativ einfach zu kultivieren. (49)

4.3 Expressionsmuster der Uhrengene in der Zelllinie MH7A

Die Zelllinie MH7A wurde ursprünglich aus den synovialen Fibroblasten einer 53-jährigen japanischen RA-Patientin gewonnen. (78) Durch Färbungen wurde deutlich, dass die einzelnen Zellen zwar die Uhrenproteine exprimieren, jede Zelle aber ihren eigenen Rhythmus besitzt. Über einen Zeitraum von 24 Stunden hinweg wurden alle vier Stunden MH7A-Zellen in Chamber Slides gegen BMAL1 und PER1 gefärbt. Es gab zu jedem Zeitpunkt je nach Zelle positive Färbungen im Zellkern, im Zytoplasma oder in beiden Zellkompartimenten. Um die MH7A-Zellen zu synchronisieren, wurden sie zwei Tage ohne FCS kultiviert. Danach konnte BMAL1 nur noch im Zytoplasma nachgewiesen werden wodurch die Synchronisation bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Die weiteren Experimente wurden ausschließlich mit synchronisierten MH7A-Fibroblasten durchgeführt.

4.3.1 IL-1 β hemmt die Expression der Uhrengene über 36 Stunden

Zunächst sollte das normale Expressionsmuster der Uhrengene in der Zelllinie MH7A in Erfahrung gebracht werden. Da bei der RA proinflammatorische Zytokine in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden können und diesen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese zugesprochen wird, wurde der Einfluss von IL-1 β auf die Expression der Uhrengene untersucht.

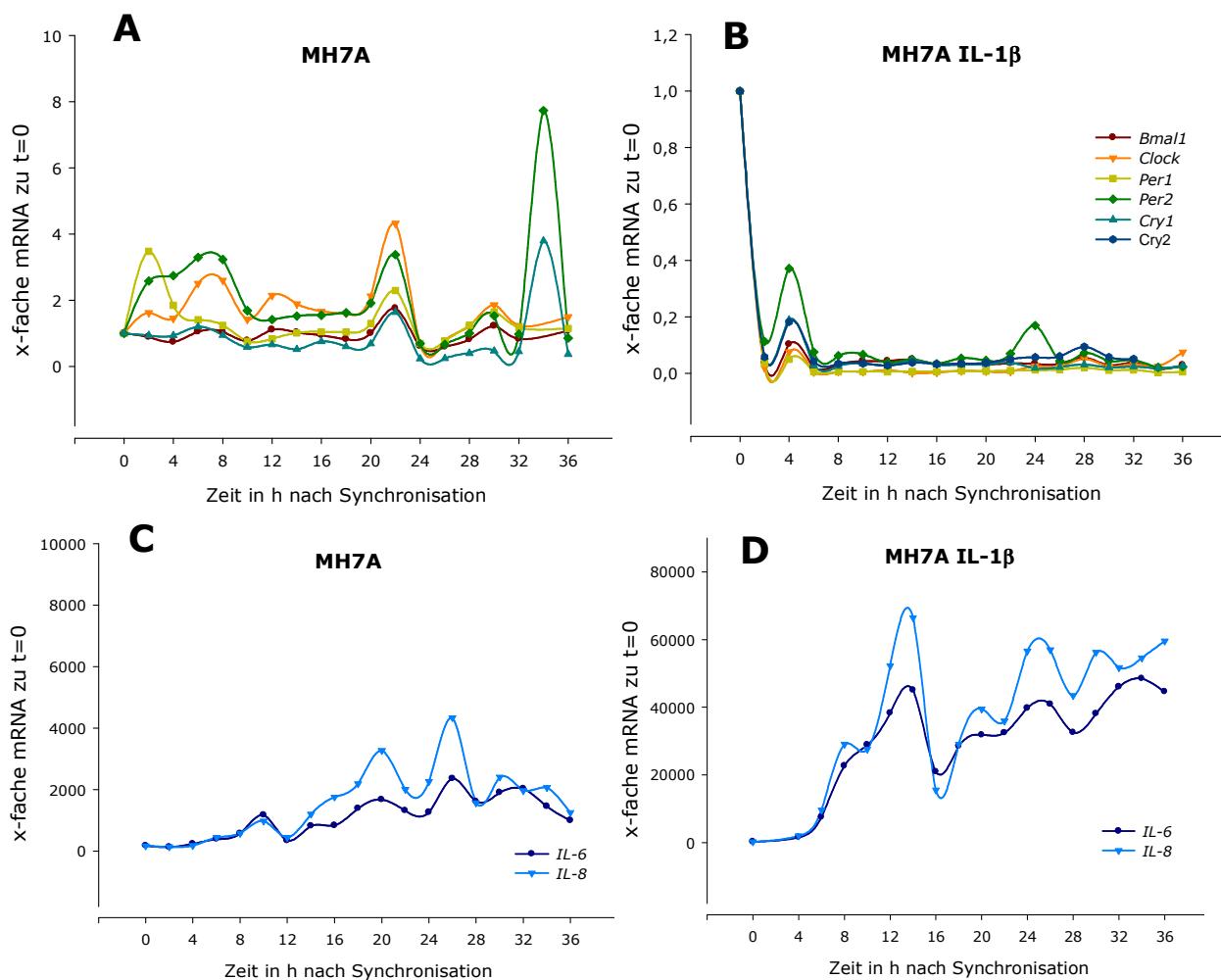


Abb. 13: **(A)** Expression der Uhrengene in der Zelllinie MH7A über einen Zeitraum von 36 Stunden. **(B)** IL-1 β (1 ng/ml) führte zu einer signifikanten Verringerung der jeweiligen Uhrengene-mRNA in MH7A-Zellen. **(C+D)** IL-6 und IL-8 wurden als sezernierte Zytokine in den Überständen gemessen, und diese bestätigten die Vitalität und Funktionalität der Fibroblasten. ($n=1$)

Über 36 Stunden hinweg wurden alle zwei Stunden Zellen geerntet und die mRNA-Menge der jeweiligen Uhrengene *Bmal1*, *Clock*, *Per1-2*, *Cry1-2* per qPCR ermittelt. Für *Per1* zeigte sich ein steiler Anstieg der mRNA nach 2 Stunden, die aber bereits nach vier Stunden wieder auf das Niveau des Ausgangswerts abfiel (Abb. 13). Auch für *Per2* ließ sich eine Zunahme der

mRNA von Beginn an feststellen, erreichte aber den ersten Maximalwert erst nach sechs Stunden. *Bmal1* und *Cry1* ließen anfangs keine größeren Schwankungen der mRNA-Menge erkennen (Abb. 13). Erst nach 22 Stunden war hier eine deutliche Zunahme erkennbar. Zu diesem Zeitpunkt nahm allerdings die mRNA aller Uhrengene synchron zu, weshalb es sich hier eventuell um einen Artefakt handeln könnte. Nach 34 Stunden war wiederum ein drastischen Anstieg von *Per2* und *Cry1*, beides negative Regulatoren, feststellbar, wogegen die übrigen Uhrengene über die letzten zwölf Stunden auf relativ ähnlichem Niveau blieben (Abb. 13). Wurde IL-1 β zu den Zellen hinzu gegeben, kam es zu einer starken Abnahme aller untersuchten Uhrengene mRNAs. Es war nach ca. 4 Stunden eine Zunahme aller mRNAs feststellbar, insgesamt blieben die Level aber weit unter dem Ausgangswert (Abb. 13).

Neben den Auswirkungen von IL-1 β wurden auch die von Cycloheximid (10 μ g/ml) untersucht. Cycloheximid ist ein Hemmstoff der Proteinbiosynthese und verhindert die Translation der mRNA durch die Ribosomen. Durch diesen Translationshemmer kam es zu einer erhöhten mRNA-Synthese der Uhrengene, am ausgeprägtesten für *Per1*, *Per2* und *Bmal1*. Die normale Rhythmusik und auch die antiphasischen Schwingungen der positiven und negativen Regulatoren gingen verloren. (Abb. 14)

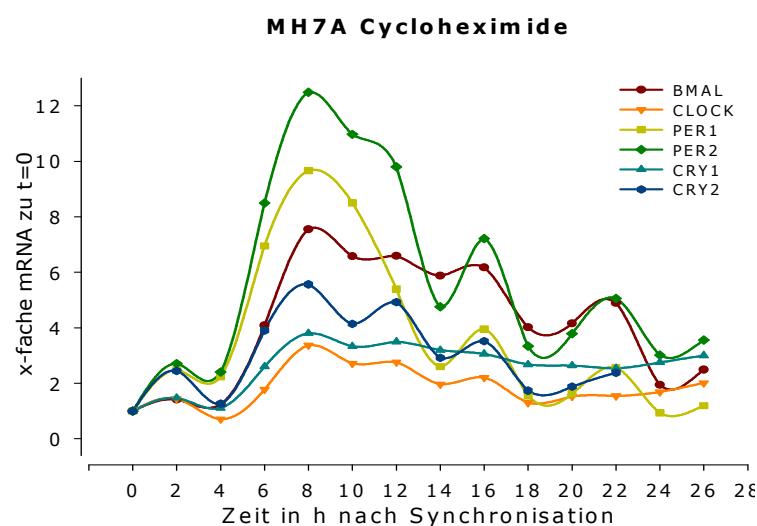


Abb. 14: MH7A-Zellen und Translationshemmer Cycloheximid. (n=1)

4.3.2 Hemmwirkung von IL-1 β und TNF über 72 Stunden zum Teil bestätigt

Der Einfluss von IL-1 β auf die Uhrengeneexpression wurde in zwei weiteren Experimenten überprüft, um die anfangs festgestellte Hemmung zu bestätigen. Außerdem wurde nun auch TNF in die Untersuchung mit aufgenommen, um zu überprüfen, ob auch das bedeutenste Zytokin bei der RA die Expression der Uhrengene beeinträchtigt.

Die drastische Herabregulierung aller Uhrengene-mRNAs ließ sich nach drei Experimenten nur zum Teil belegen (Abb. 15). Lediglich die mRNA-Level von *Clock* wurden durch IL-1 β -Applikation signifikant verringert (Abb. 15). In Bezug auf *Rev-Erb α* kam es sogar zu einer gesteigerten mRNA-Menge in den Zellen (Abb. 15). Für die restlichen Uhrengene *Bmal1*, *Per1-3* und *Cry1-2* konnte keinerlei Beeinflussung der mRNA-Menge detektiert werden (Abb. 15).

TNF zeigte auf *Clock* eine ähnliche Wirkung wie IL-1 β und führte dazu, dass dessen mRNA in signifikant niedrigeren Mengen gebildet wurde (Abb. 15). Der gleiche Effekt ließ sich bei *Per1* beobachten, dessen mRNA-Level in den Zellen durch IL-1 β unbeeinträchtigt blieb. Zusätzlich hemmte es noch die Synthese der *Cry2*-mRNA signifikant. IL-1 β führte hier zwar ebenfalls zu einer Herabregulierung, diese war jedoch nicht signifikant (Abb. 15). Auch bei *Per2* ließ sich eine tendenzielle, aber nicht signifikante Hemmung durch IL-1 β erkennen. *Bmal1*, *Per1* und *Cry1* blieben dagegen unverändert auf Kontrollniveau. *Per3* wurde durch IL-1 β gesteigert. Im Gegensatz zu *Rev-Erb α* jedoch nicht signifikant.

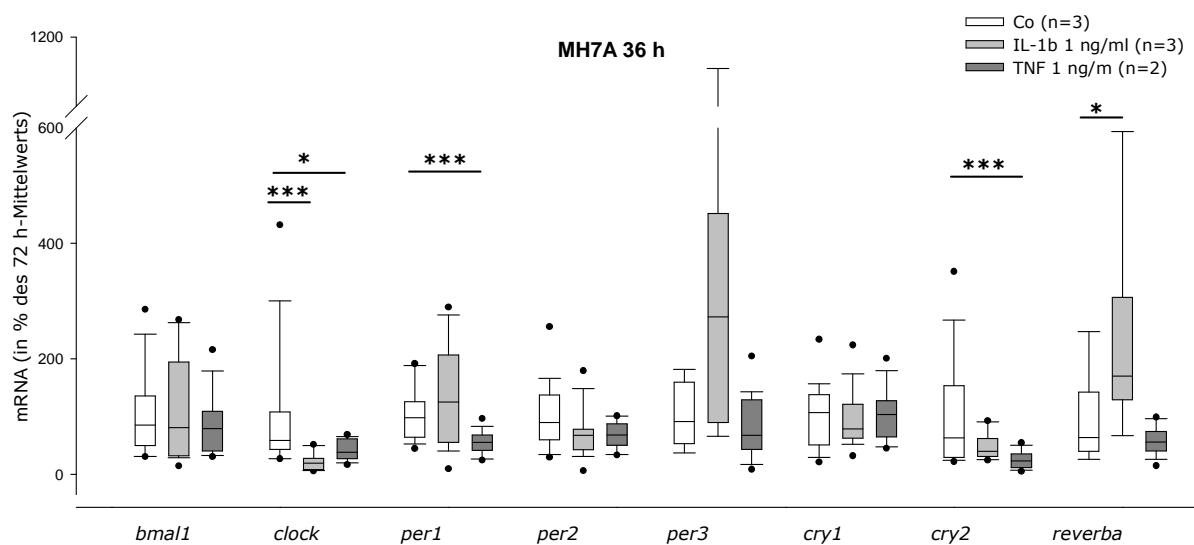


Abb. 15: Einfluss der Zytokine IL-1 β (n=3) und TNF (n=2) auf die Uhrengeneexpression in der Zelllinie MH7A über einen Zeitraum von 36 Stunden im Vergleich zu unbehandelten Zellen (n=3). Die Box Plots stellen die Schwankungen um den Mittelwert der Kontrolle über 36 h dar. Die anfänglich festgestellte, drastische Hemmung der mRNA-Mengen aller Uhrengene ließ sich nur zum Teil bestätigen. (* $\Delta p < 0,05$; *** $\Delta p < 0,001$ im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle)

TNF besaß auf die mRNA-Mengen von *Bmal1*, *Per3* und *Cry1* keinen Einfluss. Neben der signifikanten Hemmung von *Clock*, *Per1* und *Cry2* reduzierte es ebenso die mRNA von *Per2* und *Rev-erb α* , jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb. 15).

Cdc2 wird während der Mitose vermehrt exprimiert und kann somit als Marker für die Zellproliferation betrachtet werden. IL-1 β bewirkte eine signifikante Steigerung der *Cdc2*-mRNA in MH7A-Zellen über 36 Stunden hinweg (Abb. 16). TNF hatte bei dieser Zelllinie genau den gegenteiligen Effekt und reduzierte die mRNA von *Cdc2*.

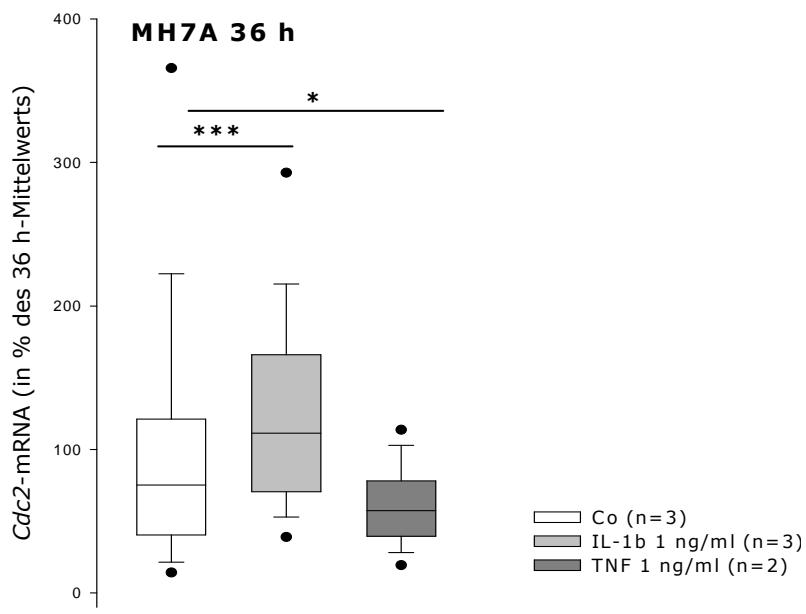


Abb. 16: *Cdc2* wird beim Übergang der Zelle von der G2- in die M-Phase des Zellzyklus vermehrt exprimiert. Die Box Plots stellen die Schwankungen um den Mittelwert der Kontrolle über 36 h dar.
(* \triangleq $p < 0,05$; *** \triangleq $p < 0,001$;
Mann-Whitney Rank Sum Test)

4.3.3 Dosis-Wirkungskurve von IL-1 β und TNF auf die Uhrenogenexpression

In zwei weiteren 36-Stunden-Experimenten wurde eine Dosis-Wirkungskurve für IL-1 β und TNF erstellt. IL-1 β wurde in vier verschiedenen Konzentrationen von 1 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,01 ng/ml und 1 pg/ml ausgetestet. TNF wurde mit 1 ng/ml und 0,1 ng/ml appliziert. Die *Bmal1*-mRNA blieb von IL-1 β gänzlich unbeeinflusst (Abb. 17). Für die anderen Uhrenogene *Clock*, *Per1-3*, *Cry1-2* und *Rev-Erb α* konnte stets eine dosisabhängige Verminderung der mRNA in der Zelle gezeigt werden. Hier kam es jedoch nicht bei der höchsten IL-1 β -Konzentration von 1 ng/ml zur stärksten Hemmung, sondern jeweils bei der niedrigsten (1 pg/ml) (Abb. 17). Bei 1 pg/ml wurden die mRNA-Mengen aller Uhrenogene, ausgenommen *Bmal1*, signifikant verringert. Bei *Cry1* war in höheren Dosen keine Hemmung mehr feststellbar. Mit einer Konzentration von 0,01 ng/ml IL-1 β wurden *Clock*, *Per1-3*, *Cry2* und *Rev-Erb α* signifikant gehemmt (Abb. 17). 0,1 ng/ml IL-1 zeigte nicht mehr die gleiche Hemmwirkung auf die Cryptochrome wie die niedrigeren Dosen. *Clock* und *Per1-3* wurden aber auch hier weiterhin weniger exprimiert.

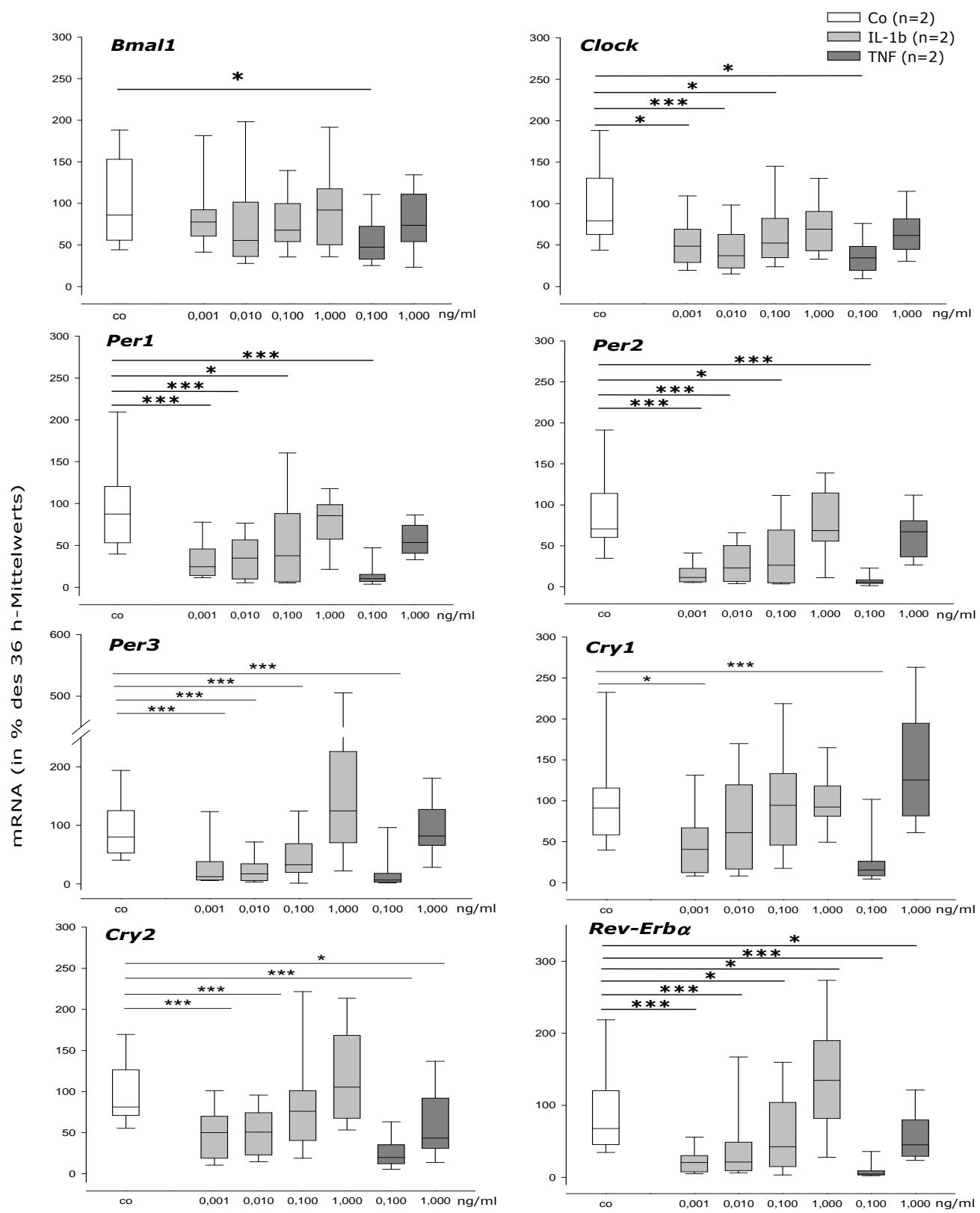


Abb. 17: Der Einfluss von IL-1 β (hellgrau) bzw. TNF (dunkelgrau) auf die Uhrengegenexpression wurde in einer jeweiligen Dosis-Wirkungskurve überprüft (jeweils n=2). Die Box Plots stellen die Schwankungen um den Mittelwert der Kontrolle über 36 h dar. (* $\triangleq p < ,05$; *** $\triangleq p < 0,001$; Mann-Whitney Rank Sum Test)

Außer für *Bmal1* folgte die Hemmung der Uhrengeneexpression einer Dosis-Wirkungskurve, wobei hier nicht die höchste sondern die niedrigste Konzentration die jeweiligen mRNA-Mengen am stärksten reduzierte.

Bei der Applikation von TNF ergab sich ein ähnliches Bild. Auch hier zeigte die niedrigere Dosis die stärkste Wirkung (Abb. 17). Dies traf auf jedes der untersuchten Uhrengene zu. Bei einer Konzentration von 1 ng/ml verringerte sich einzig die mRNA-Mengen von *Cry2* und *Rev-Erbα*. Bei *Bmal1*, *Clock*, *Per1-3* und *Cry1* blieb die Expression dagegen unbeeinflusst.

Die Vitalität und Funktionalität der Zellen wurde erneut mittels IL-6- und IL-8-Produktion bestimmt. Für beide Zytokine ließ sich eine dosisabhängige Steigerung der Sekretion nachweisen. Die detektierbare Menge an IL-6 bzw. IL-8 erhöhte sich proportional mit zunehmender IL-1 β bzw. zunehmender TNF-Konzentration. (Abb. 18)

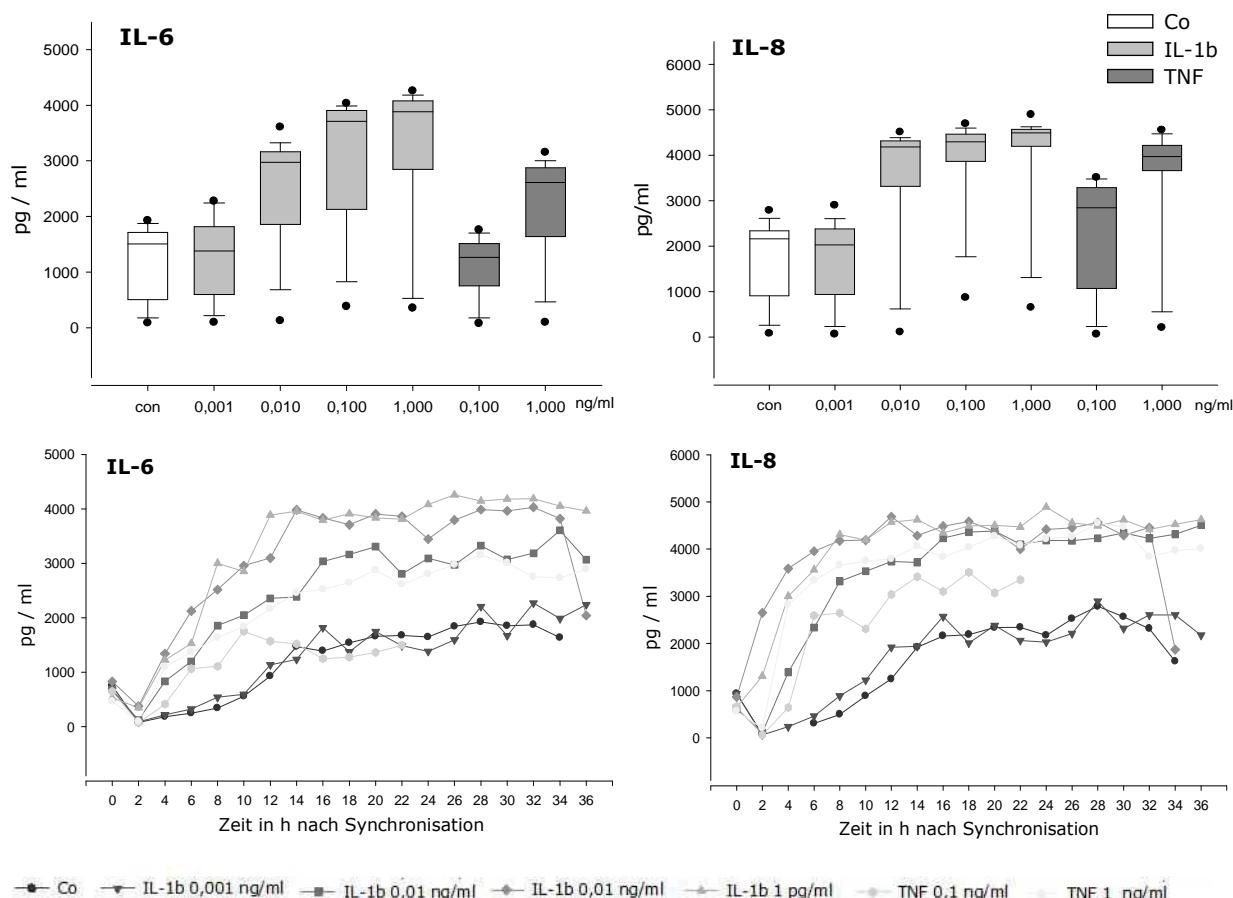


Abb. 18: IL-1 β und TNF sind beides Stimuli die Fibroblasten zur Produktion und Sekretion von Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 8 (IL-8) anregen. Die Box Plots stellen die Schwankungen um den Mittelwert der Kontrolle (Co) über 36 h dar (n=1).

4.4 Effekte von IL-1 β und TNF auf primäre OA-SFs

Da IL-1 β zur einer deutlichen Hemmung der Uhrengegenexpression bei MH7As führte, wurde nun auch dessen Wirkung auf primäre synoviale Fibroblasten eines OA-Patienten über 36 Stunden hinweg untersucht. In einem ersten Versuch führte die Applikation von 1 ng/ml IL-1 β hier ebenso zu einer Abflachung der Amplituden und zu generell verminderten mRNA-Level der untersuchten Uhrenogene *Bmal1*, *Clock*, *Per1-2*, *Cry1-2* und *Rev-Erb α* . (Abb. 19)

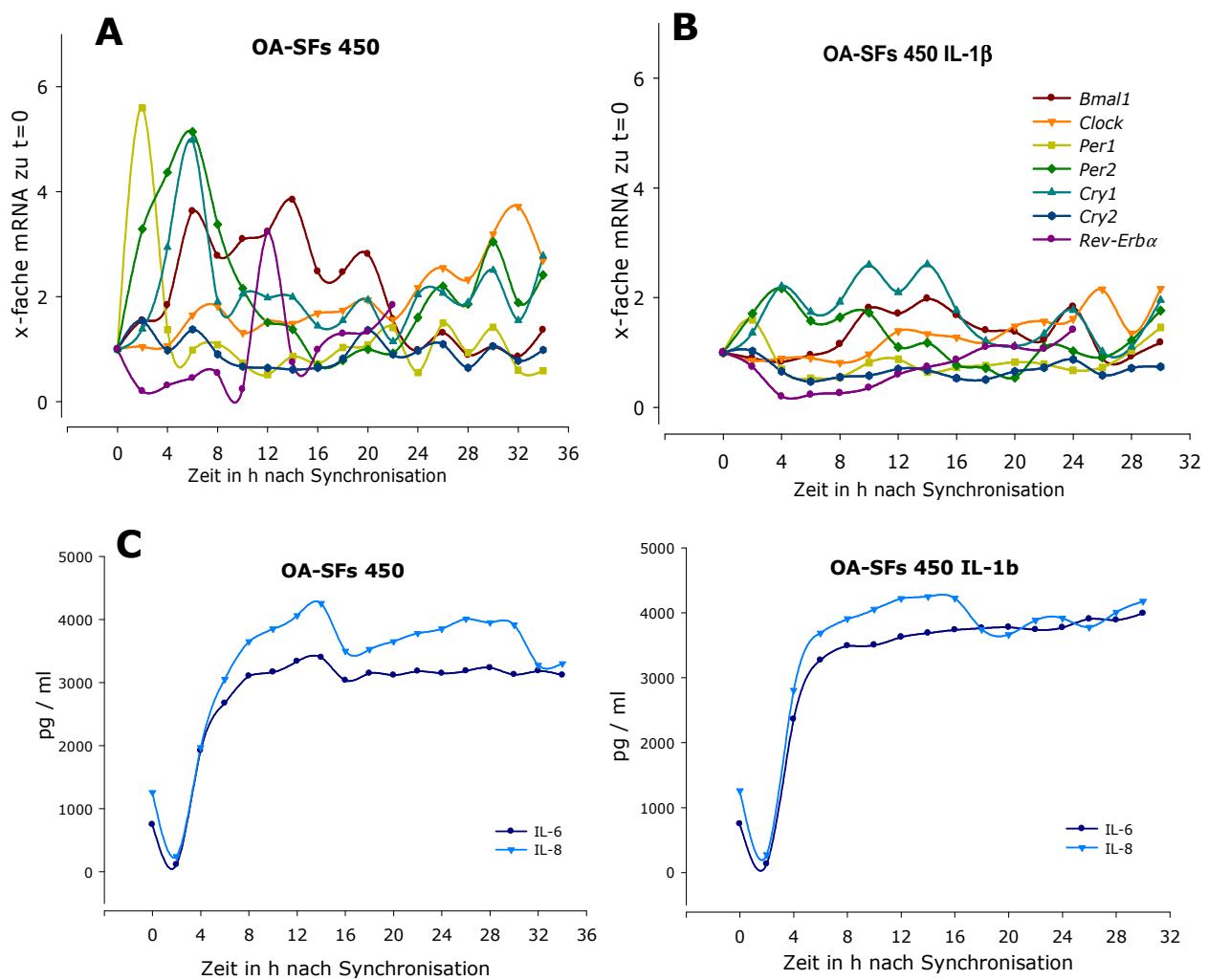


Abb. 19: **(A)** Nach Synchronisation ausgelöste Schwingungen der mRNA der Uhrenogene *Bmal1*, *Clock*, *Per1-2*, *Cry1-2* und *Rev-Erb α* bei primären synovialen Fibroblasten eines OA-Patienten. **(B)** Durch IL-1 β wurden die Schwingungen aller Uhrenogene gedämpft. **(C+D)** Die Vitalität der OA-SFs wurde durch IL-1 β nicht beeinträchtigt, was deren IL-6- und IL-8-Produktion bewiesen.

Daraufhin wurden weitere OA-Patienten in die Untersuchung mit eingeschlossen ($n=6$) und zusätzlich noch die Wirkung von TNF (1 ng/ml) auf die Uhrengeneexpression untersucht ($n=3$). Die anfangs festgestellte Hemmung ließ sich auch hier wie in den MH7A-Zellen für IL-1 β zum Teil bestätigen und TNF zeigte wenig Auswirkungen über 36 Stunden hinweg (Daten nicht gezeigt). Nur die *Per2*-mRNA wurde durch IL-1 β signifikant reduziert. Im Fall von *Cry2* ergab sich sogar sowohl durch IL-1 β als auch durch TNF eine Steigerung der mRNA im Laufe der 36 Stunden.

Die Folgeexperimente wurden auf einen Zeitraum von 72 Stunden ausgedehnt, um bis zu drei Zyklen verfolgen zu können (Abb. 20). TNF bewirkte bei allen untersuchten Uhrengenen eine signifikante Reduktion der mRNA-Level bei primären OA-SFs über 72 Stunden. Die mRNA-Mengen von *Per2* und *Per3* wurden durch IL-1 β signifikant ebenfalls verringert, die von *Clock* dagegen leicht gesteigert. Die Expression der übrigen Uhrengene *Bmal1*, *Per1*, *Cry1-2* und *Rev-Erb α* blieb durch IL-1 β unbeeinflusst im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 20).

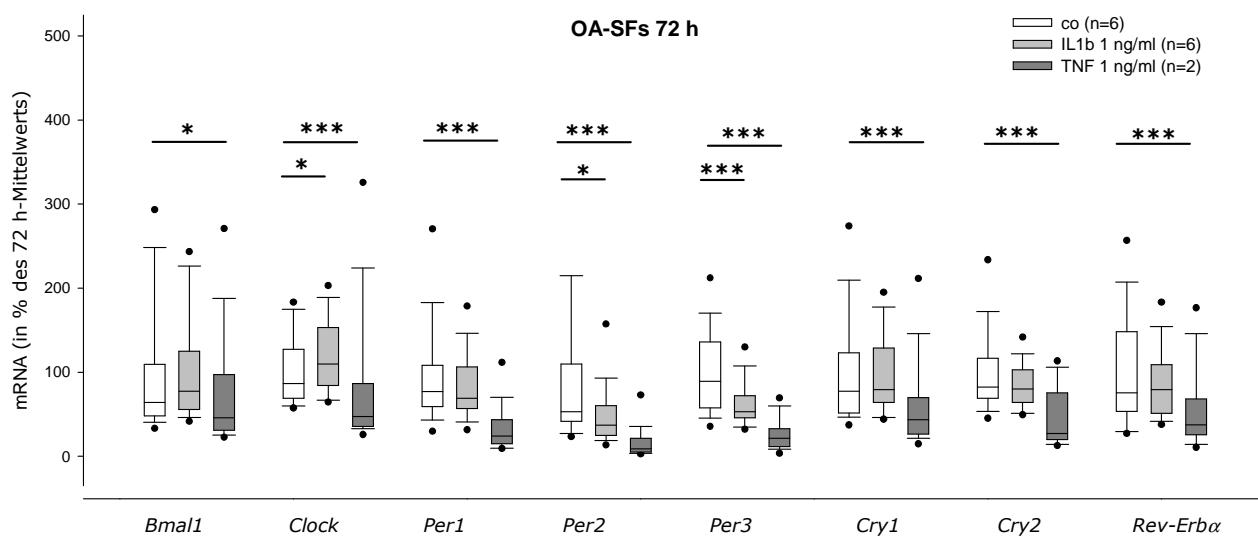


Abb. 20: Auswirkungen der Zytokine IL-1 β ($n=6$) und TNF ($n=2$) auf die mRNA-Level der untersuchten Uhrengene im Vergleich zur Kontrolle ($n=6$). Die Box Plots stellen die Schwankungen um den Mittelwert der Kontrolle (Co) über 72 h dar. (* $\triangle p < 0,05$; *** $\triangle p < 0,001$; Mann-Whitney Rank Sum Test)

Neben den Uhrengenen wurde auch die mRNA von *Cdc2* quantifiziert. Dieses Gen wird beim Übertritt der Zelle von der G2- in die M-Phase des Zellzyklus vermehrt exprimiert und ist somit ein Indikator für die Zellproliferation.

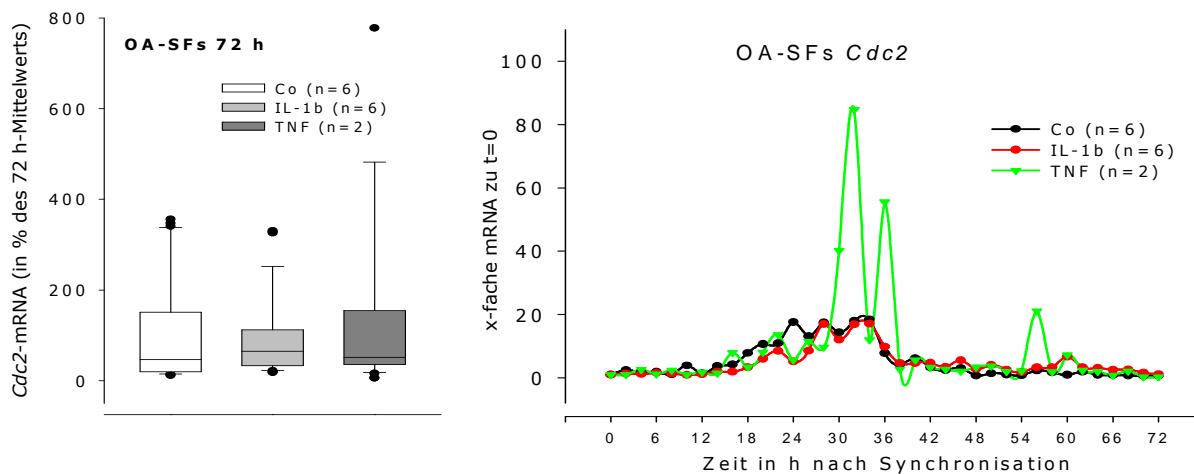


Abb. 21: Die *Cdc2*-Expression in primären OA-SFs dargestellt als Schwankungen um den Mittelwert der Kontrolle (Co) in Box Plots und als Verlaufskurve der x-fachen mRNA-Menge im Vergleich zum Ausgangswert. Jeweils Vergleich der Kontrollbedingung (Co) ($n=6$) mit dem Einfluss von IL-1 β ($n=6$) und TNF ($n=2$) auf die Expression (Box Plots: Mann-Whitney Rank Sum Test).

Während des 72-Stunden-Zeitraums kam es zu einem Zellteilungszyklus (Abb. 21). Die *Cdc2*-mRNA wurde zwischen den Zeitpunkten 20 und 34 Stunden stark hochreguliert. IL-1 β hatte darauf keinen Einfluss, TNF führte zu vier Zeitpunkten zu einem enormen Anstieg (Abb. 21).

Die Grundlage der Box Plots bildeten die Einzelwerte der Verlaufskurven. Hier wurde zu jedem Zeitpunkt die mRNA-Menge der jeweiligen Uhrentogene in Relation zum Ausgangswert gesetzt. Der Mittelwert der mRNA-Menge unter Kontrollbedingung entspricht 100 % im Box Plot (Abb. 20; Abb. 21)

Im Kurvenverlauf konnte für *Clock* in allen drei Gruppen (unbehandelt, IL-1 β , TNF) keine wirkliche Schwingung nachgewiesen werden. Die mRNA-Level blieben über den Untersuchungszeitraum relativ konstant und wurden durch die applizierten Zytokine nicht beeinflusst (Abb. 22).

Auch der zweite und vielleicht wichtigste positive Regulator der molekularen Uhr *Bmal1* oszillierte zwei- bis dreimal während des Untersuchungszeitraums. Das erste Maximum wurde nach zehn Stunden erreicht und lag somit deutlich hinter den Anfangsspeaks der Periods und Cryptochrome (Abb. 22). Dieser antiphase Anstieg war auch für *Bmal1* und *Rev-Erb α* zu beobachten. Ab dem Zeitpunkt ab dem die *Rev-Erb α* -mRNA in den Zellen zunimmt (12-14 Stunden), fällt die *Bmal1*-mRNA wieder ab (Abb. 22; Abb. 23).

Der Anstieg der mRNA der negativen Regulatoren *Per1-3*, *Cry1* und *Cry2* erfolgte innerhalb der ersten 2 Stunden unter Kontrollbedingungen sehr schnell. Die mRNA-Menge von *Per1* nahm dabei um das 25-fache zu, die von *Per2* sogar um das fast 30-fache (Abb. 22). Solche

Steigerungen wurden bei keinem anderen untersuchten Uhrengegen beobachtet. Im Fall von *Per1* fiel die mRNA danach direkt wieder ab, jedoch wurde nach vier Stunden immer noch die ca. 9-fache Menge des Ausgangswertes detektiert (Abb. 22). Dieser Wert wurde auch nach 22 Stunden wieder erreicht und weitere 24 Stunden später war ein erneuter Anstieg erkennbar, wobei noch die 7-fache mRNA-Menge erreicht wurde. Für *Per1* ließ sich also eine gut messbare Oszillation auslösen die über drei Zyklen hinweg Bestand hatte, wenn auch die Schwingung pro Zyklus stetig abflachte (Abb. 22).

Die Anwesenheit von IL-1 β führte bei Analyse der Schwankungen um den Kontrollmittelwert zu keiner signifikanten Reduktion der *Per1*-mRNA (Abb. 20). Deutlicher wird der Einfluss der Zytokine auf die mRNA-Synthese im Kurvenverlauf (Abb. 22). Der charakteristisch steile Anfangspeak fiel dabei wesentlich flacher aus. Es wurde nur noch ca. ein Drittel des Maximalwertes der Kontrolle erreicht, unter TNF-Einfluss sogar nur noch ein Sechstel (Abb. 22). Das zweite Maximum wurde bei Anwesenheit von IL-1 β im Medium wie bei der Kontrolle nach 22 Stunden erreicht und lag auch fast auf Kontrollniveau. Vier Stunden nach der Kontrolle, nämlich zum Zeitpunkt 50 Stunden, stieg die *Per1*-mRNA noch ein weiteres Mal auf die 6,8-fache Menge des Ausgangswertes an (Abb. 22). Die Oszillation von *Per1* wurde im Gesamtbild durch IL-1 β zwar abgeflacht, war aber prinzipiell noch erkennbar (Abb. 22).

Die hemmende Wirkung von TNF auf die mRNA der Uhrengegen war bereits in den Box Plots signifikant (Abb. 20), was der Kurvenverlauf zusätzlich bestätigt (Abb. 22). Wie bereits erwähnt wurde nach vier Stunden ein *Per1*-Maximalwert von nur ca. Faktor 4 erreicht im Gegensatz zu Faktor 23,5 unter Kontrollbedingungen. Im weiteren Verlauf war kein erneuter Anstieg der *Per1*-mRNA erkennbar (Abb. 22).

Bei *Per2* ergab sich ein ähnliches Bild wie bei *Per1*. Es kam ebenfalls zu einem sehr schnellen und steilen Anstieg der mRNA innerhalb der ersten Stunden unter Kontrollbedingungen (Abb. 22). Im Gegensatz zu *Per1* erreichte *Per2* in der Kontrolle den ersten Maximalwert 4 Stunden nach Beginn des Experiments. *Per1* zeigte einen klaren Peak, wogegen es bei *Per2* zu einer Art Doppelspitze kam, da der zweite Maximalwert nach 10 Stunden erreicht wurde. (Abb. 22) Auch als die mRNA nach 20 Stunden erneut zunahm, ließen sich wieder zwei Spitzen erkennen, wenn dies auch sehr viel flacher als am Anfang des Experiments war. Zwei weitere einzelne Peaks waren nach 46 und nach 60 Stunden detektierbar (Abb. 22).

Wurden die OA-SFs mit TNF behandelt, konnte man die Doppelspitzen zu Beginn wie in den Kontrollen beobachten, jedoch mit stark verringerten Amplituden (Abb. 22). Im Gegensatz zu den Maximalwerten der Kontrolle von 29,3- und 22,3-fachen Anstieg kam es in Anwesenheit von TNF nur zum 3,2- bzw. 3,7-fachen Anstieg der *Per2*-mRNA. Diese Werte lagen auch deutlich unterhalb der Werte der IL-1 β -Behandlung (Abb. 22).

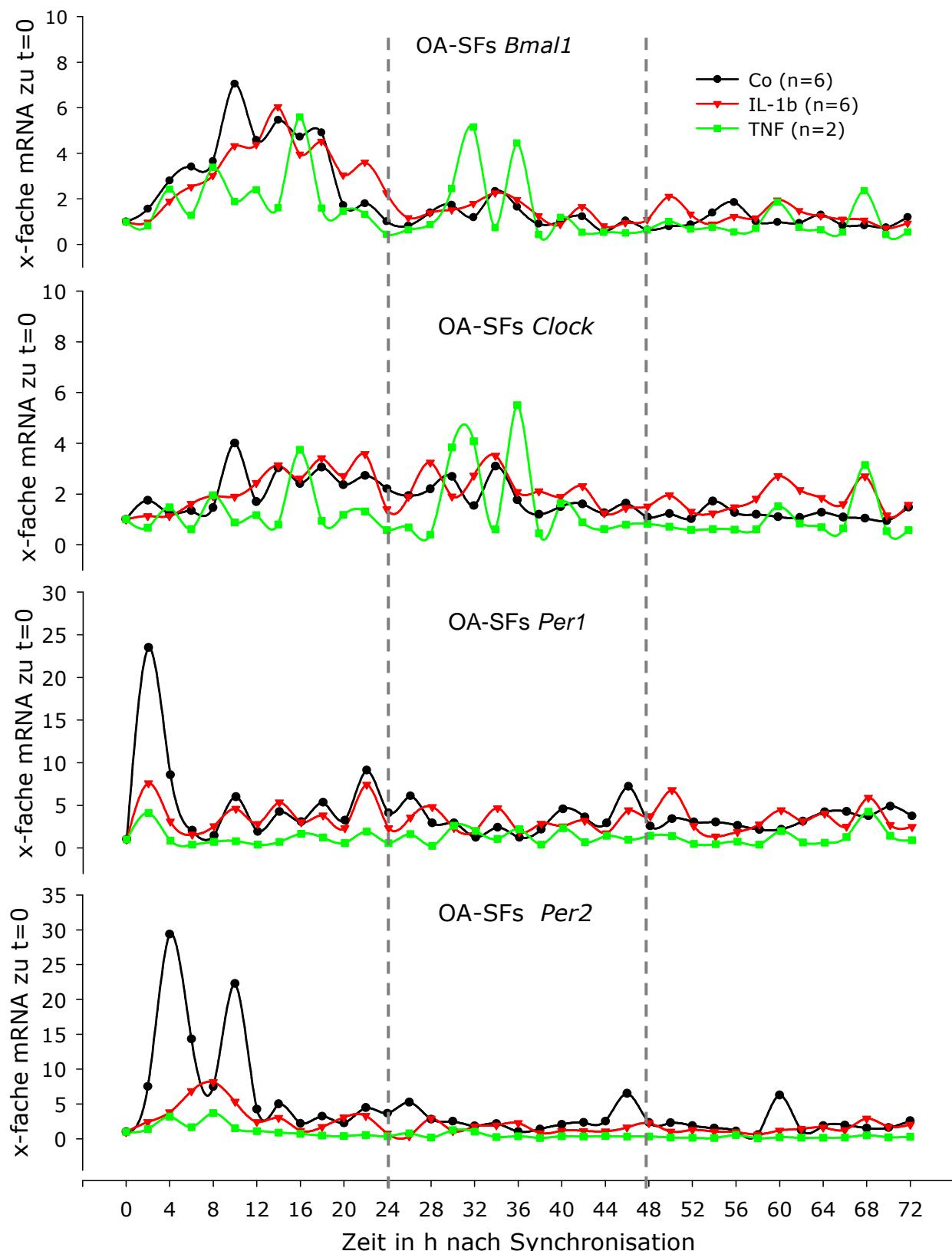


Abb. 22: Verlauf der Zu- und Abnahmen der Uhrengegen-mRNAs von *Bmal1*, *Clock*, *Per1* und *Per2* in OA-SFs unter Kontrollbedingungen ($n=6$) und unter Einfluss von IL-1 β ($n=6$) und TNF ($n=2$). Die Ergebnisse aller untersuchten primären Fibroblasten der verschiedenen OA-Patienten wurden gemittelt und die Werte der jeweiligen Zeitpunkte in Relation zum Ausgangswert ausgedrückt.

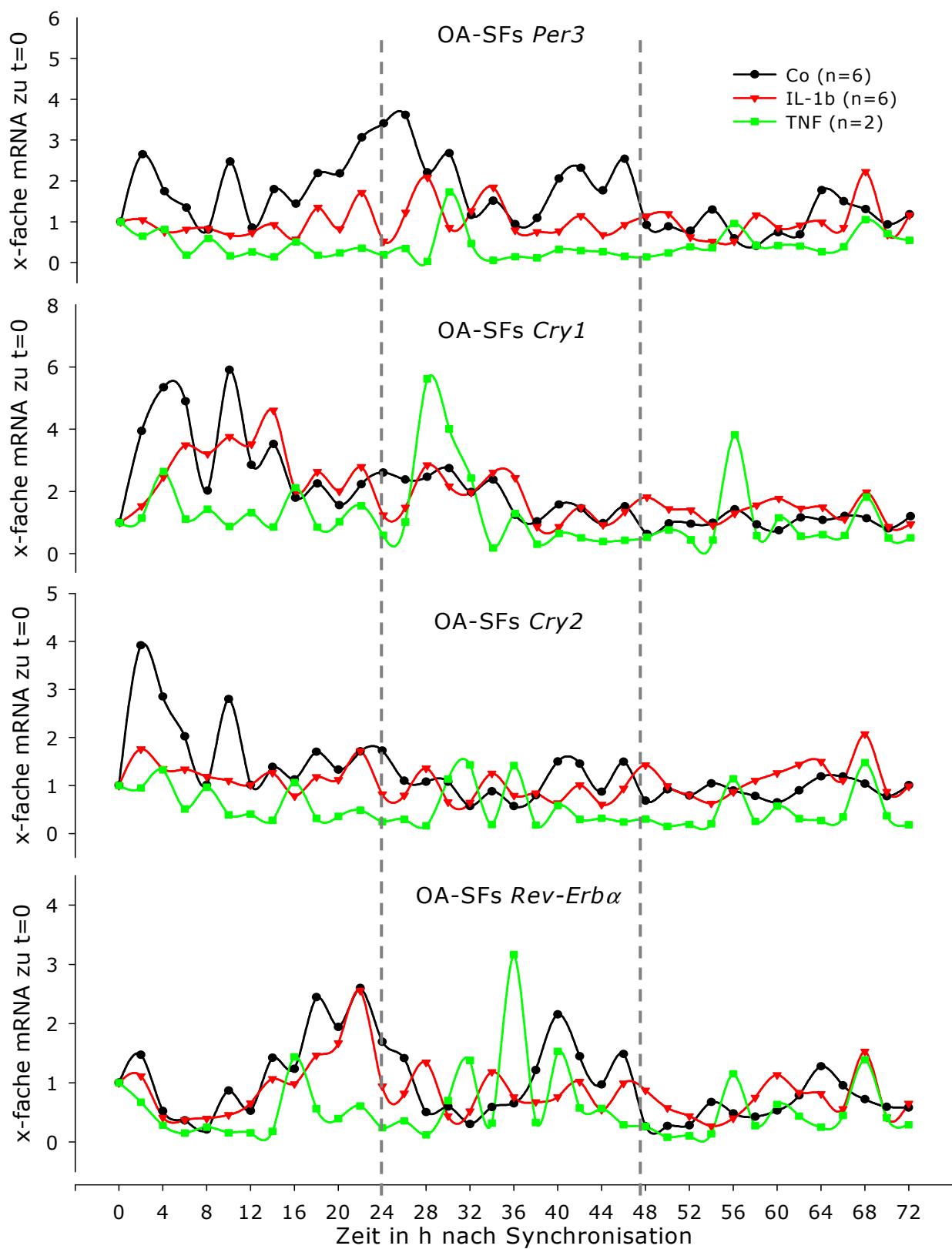


Abb. 23: Verlauf der Zu- und Abnahmen der Uhrengegen-mRNAs von *Per3*, *Cry1*, *Cry2* und *Rev-Erba* in OA-SFs unter Kontrollbedingungen (n=6) und unter Einfluss von IL-1 β (n=6) und TNF (n=2). Die Ergebnisse aller untersuchten primären Fibroblasten der verschiedenen OA-Patienten wurden gemittelt und die Werte der jeweiligen Zeitpunkte in Relation zum Ausgangswert ausgedrückt.

Im weiteren Verlauf kam es zu keinen bemerkenswerten Zunahmen mehr. Die in den Zellen vorhandenen mRNA stagnierte auf Level des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 0.

Auch die mRNA von *Per3* nahm innerhalb der ersten zwei Stunden unter Kontrollbedingungen deutlich zu (Abb. 23). Hier wurde jedoch nicht einmal ein dreifacher Anstieg verzeichnet im Gegensatz zu den 20- bis 30-fachen Anstiegen bei *Per1* und *Per2*. Nach exakt weiteren 24 Stunden wurde der nächste Peak erreicht. Die Oszillation von *Per3* kennzeichnete vor allem, dass es sich hierbei nicht um einzelne Peaks handelte, sondern dass die mRNA über einige Stunden auf relativ hohem Niveau verblieb, bevor sie wieder abnahm. Es konnten auch noch ein dritter und ein vierter Anstieg verzeichnet werden, wobei der dritte bereits nach weniger als 24 Stunden sichtbar wurde. Der Abstand vom dritten zum vierten Peak umfasste allerdings wieder einen kompletten Zyklus.

Durch IL-1 β wurde die anfängliche Zunahme der *Per3*-mRNA verhindert und es konnte auch im weiteren Verlauf keine 24-Stunden-Rhythmus beobachtet werden (Abb. 23). TNF führte wie bereits bei den anderen beiden Periods beschrieben zu keinen größeren Schwankungen des mRNA-Levels in den OA-SFs und somit beinahe zu einem linearen Verlauf der Kurve (Abb. 23).

Cry1 und *Cry2* ließen beide keine merklichen Oszillationen erkennen. Es kam bei beiden zu einem raschen Anstieg der mRNA innerhalb der ersten Stunden, wie schon bei den Periods beobachtet (Abb. 23). Und wie bereits bei *Per2* beschrieben, war hier jeweils eine Doppelspitze zu erkennen. Die mRNA-Menge sank erst nach 12-14 Stunden wieder merklich ab. Für beide *Crys* konnten keine weiteren rhythmischen Schwankungen mehr ausgemacht werden. IL-1 β verringerte ebenso wie bei allen drei Periods den Anfangspeak deutlich (Abb. 23). Zwischen 6 und 14 Stunden verblieb die mRNA von *Cry1* auf einem Plateau von 3,5- bis 4,6-facher Menge des Ausgangswertes. Zu einem zweiten und letzten Plateau kam es zwischen den Zeitpunkten 28-36 Stunden, wobei dieses nur noch Werte von 2,2- bis 2,8-facher Menge des Ausgangswertes umfasste (Abb. 23). TNF konnte bei *Cry1* eine Oszillation der mRNA innerhalb von drei Zyklen auslösen. Zwar kam es anfangs nur zu einem sehr schwach ausgeprägten Peak nach 6 Stunden, aber der zweite und dritte Peak je im Abstand von ca. 24 Stunden erreichten Werte von jeweils 5,6- und 3,8-facher Menge des Ausgangswertes.

Bei *Cry2* waren nach der anfänglichen Doppelspitze mit Werten von 3,9- und 2,8-facher Menge des Ausgangswertes keine nachfolgenden, bemerkenswerten Zunahmen der mRNA-Menge unter Kontrollbedingungen zu beobachten (Abb. 23). Sowohl IL-1 β als auch TNF führten zu einem gänzlich abgeflachten Kurvenverlauf. Es gab somit keine wirklichen quantitativen Veränderungen der *Cry2*-mRNA in den OA-SFs über 72 Stunden hinweg (Abb. 23).

Der letzte untersuchte negative Regulator der molekularen Uhr *Rev-Erb α* ließ unter allen drei Versuchsbedingungen eine robuste Oszillation der mRNA-Anhäufung erkennen, wobei die Maximalwerte die 3,2-fache Menge des Ausgangswertes nicht überschritten. Wie bereits für *Per3* beschrieben, manifestierte sich die mRNA-Zunahme nicht in kurzen, steilen Peaks, sondern eher in breiteren Peaks. Diese Peaks verloren aber mit jedem Zyklus an Höhe und auch Breite. Durch IL-1 β wurde der Kurvenverlauf ein wenig abgeflacht (Abb. 23). Unter TNF-Einfluss war zu fast jedem Zeitpunkt weniger mRNA als in der Kontrolle vorhanden (Abb. 23). Die hier wieder kurzen und steilen Peaks wurden alle 20 Stunden verzeichnet (nach 16, 36 und 56 Stunden) und ein weiterer nach 68 Stunden.

4.4 Effekte von IL-1 β und TNF auf RA-SFs

In Bezug auf *Bmal1* zeigte sich bei RA-SFs das gleiche Bild wie bei den OA-SFs. Hier ergaben sich keine Unterschiede der Gesamt-mRNA über 72 Stunden unabhängig davon, ob die Zellen mit IL-1 β oder TNF stimuliert wurden oder nicht (Abb. 24). Das mRNA-Level war in allen drei Gruppen gleich. IL-1 β führte bei *Per1* und *Per2* zu einem leichten, aber signifikanten Anstieg der mRNA und bei *Rev-Erb α* dagegen zu einer leichten Abnahme (Abb. 24). Bei *Clock*, *Per3*, *Cry1* sowie *Cry2* hatte IL-1 β keinerlei Auswirkungen.

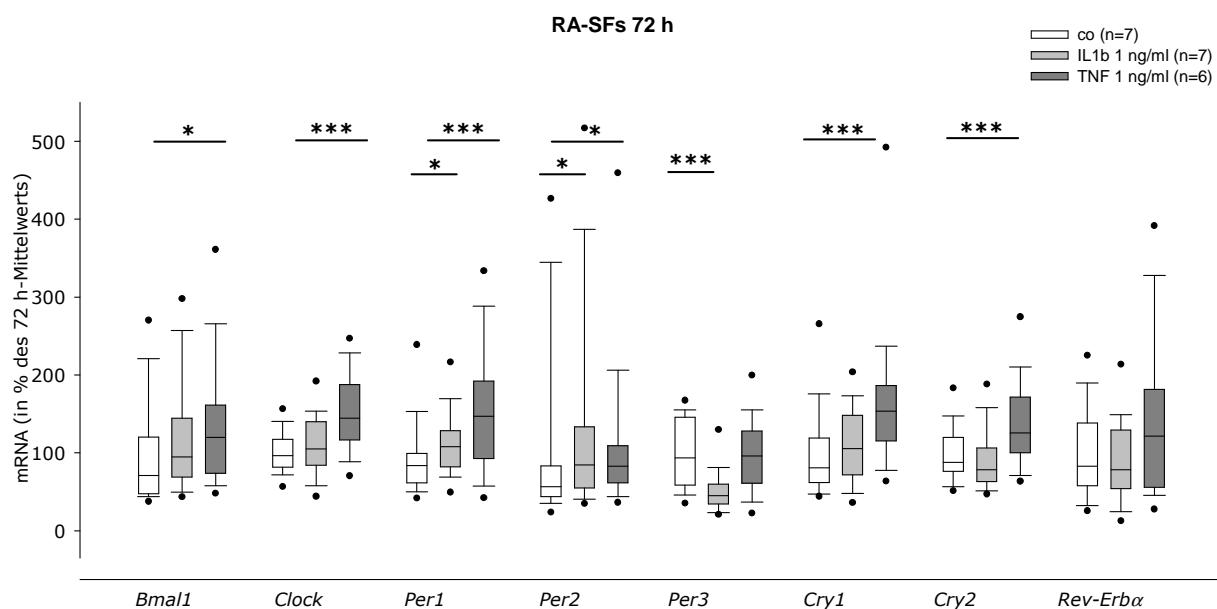


Abb. 24: Auswirkungen der Zytokine IL-1 β (n=7) und TNF (n=6) auf die mRNA-Level der untersuchten Uhrengene im Vergleich zur Kontrolle (n=6) bei RA-SFs. Die Box Plots stellen die Schwankungen um den Mittelwert der Kontrolle (Co) über 72 h dar. (* \triangleq p<0,05; *** \triangleq p < 0,001; Mann-Whitney Rank Sum Test)

Im Gegensatz dazu blieben nur *Per3* und *Cry1* unbeeinflusst durch TNF. Von allen anderen Uhrengegen-mRNAs wurde signifikant mehr in den TNF-behandelten RA-SFs vorgefunden als unter der Kontrollbedingung (Abb. 24). Die Wirkung dieses Zytokins war auf RA-SFs also genau entgegengesetzt der Wirkung auf OA-SFs, in denen es die Expression aller untersuchten Uhrengegene hemmte (Abb. 20).

Das Expressionsmuster von *Cdc2* unterschied sich in RA-SFs jedoch stark von dem in OA-SFs. In OA-SFs war ein deutlicher Anstieg der *Cdc2*-mRNA zwischen den Zeitpunkten 20 und 34 Stunden erkennbar. Anschließend fielen die Werte jedoch wieder auf das Anfangsniveau ab. Nur TNF führte zu einzelnen drastisch höheren Werten. (Abb. 25)

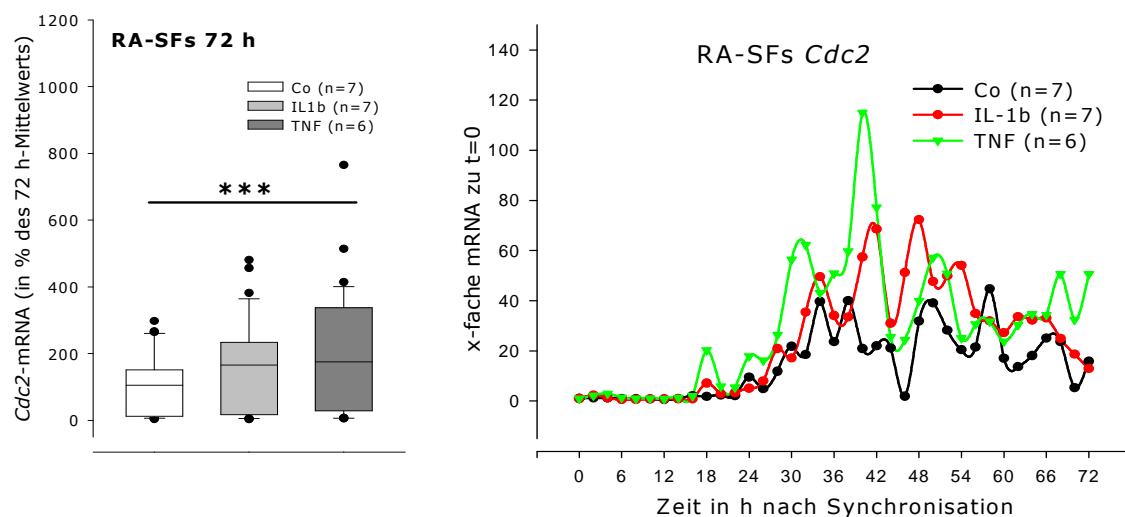


Abb. 25: Die *Cdc2*-Expression in primären RA-SFs dargestellt als Schwankungen um den Mittelwert der Kontrolle (Co) in Box Plots und als Verlaufskurve der x-fachen mRNA-Menge im Vergleich zum Ausgangswert. Jeweils Vergleich der Kontrollbedingung (Co) (n=7) mit dem Einfluss von IL-1 β (n=6) und TNF (n=2) auf die Expression. (***) $\triangleq p < 0,001$; Mann-Whitney Rank Sum Test)

Bei den RA-SFs war ebenfalls nach ca. 20 Stunden ein deutlicher Anstieg von *Cdc2* erkennbar (Abb. 25). Allerdings fielen die Werte zu keinem Zeitpunkt während des Untersuchungszeitraums wieder wirklich ab.

Unter Kontrollbedingungen waren bis zum Zeitpunkt 72 Stunden starke Schwankungen der *Cdc2*-mRNA feststellbar (Abb. 25). Diese Schwankungen ergaben sich ebenfalls in IL-1 β - oder TNF-behandelten RA-SFs, jedoch bei generell erhöhten *Cdc2*-Leveln. Im Fall von TNF war die nachgewiesene *Cdc2*-Menge in den RA-SFs signifikant höher als in der Kontrolle.

Die Grundlage der Box Plots bildeten wiederum die Einzelwerte der Verlaufskurven. Hier wurde zu jedem Zeitpunkt die mRNA-Menge der jeweiligen Uhrenogene in Relation zum

Ausgangswert gesetzt. Der Mittelwert der mRNA-Menge unter Kontrollbedingung entspricht 100 % im Box Plot (Abb. 24; Abb. 25).

Der Kurvenverlauf der *Bmal1*-mRNA unterschied sich zwischen OA-SFs und RA-SFs kaum. (Abb. 22; Abb. 26) Es kam innerhalb der ersten Stunden zu einem Anstieg von *Bmal1*, der nach 12 Stunden einen Scheitelwert des 5,6-fachen des Ausgangswertes der *Bmal1*-mRNA erreichte und anschließend bis zum Zeitpunkt 20 Stunden wieder fast auf diesen Ausgangswert abfiel (Abb. 26). Nach ca. 30 Stunden kam es zu einem erneuten Anstieg der mRNA über ca. 12-14 Stunden, wobei dieser nur noch Werte von maximal 2,5 erreichte. Ein dritter Anstieg fiel nur noch halb so hoch aus wie der zweite, war aber zwischen 56 und 68 Stunden noch erkennbar (Abb. 26). IL-1 β führte dazu dass die Maximalwerte des ersten und zweiten Zyklus erst 2-4 Stunden später erreicht wurden. Ein dritter Zyklus war im Kurvenverlauf nicht mehr auszumachen.

Wurden die RA-SFs in TNF-haltigem Medium kultiviert, führte das allgemein zu mehr *Bmal1*-mRNA in den Zellen. Hier waren drei Oszillationen deutlich erkennbar. Zwar wurde im ersten Zyklus bereits nach vier Stunden ein Maximalwert erreicht, aber nach weiteren zehn Stunden wurde ein zweiter Scheitelwert erreicht, der mit dem der IL-1 β -behandelten Zellen zusammenfiel und somit auch zwei Stunden verzögert zum Maximalwert der Kontrolle auftrat (Abb. 26). Zwischen den Zeitpunkten 30 und 49 Stunden sowie 56 und 66 Stunden kam es zu zwei weiteren mRNA-Zunahmen. Vor allem im dritten Zyklus war dieser Anstieg deutlicher als der unter Kontrollbedingungen.

Auch bei *Clock* ergab sich ein ähnliches Bild, wie es bereits in den OA-SFs beobachtet wurde (Abb. 22; Abb. 26). Unter Kontrollbedingungen waren keine merklichen Oszillationen im 24-Stundenrhythmus feststellbar, was sich auch durch die Zugabe von IL-1 β zum Kulturmedium nicht veränderte. TNF führte dagegen zu einem durchgehend höheren *Clock*-mRNA-Level, wobei auch hier keine Oszillationen deutlich wurden (Abb. 26).

Bei *Per1* war unter allen drei Kulturbedingungen wieder der charakteristische Anfangspeak nach zwei Stunden erkennbar (Abb. 26). Die Kontrolle erreichte hierbei einen Maximalwert von knapp 18. Sowohl IL-1 β als auch TNF ließen diesen Peak jeweils etwas niedriger ausfallen, wenn auch nicht annähernd so stark vermindert wie in den OA-SFs. Im übrigen Verlauf waren weder für die Kontrolle noch für die zytokinbehandelten Zellen auffälligen Zunahmen der *Per1*-mRNA detektierbar (Abb. 26). Beide Zytokine führten jedoch zu einer generellen Erhöhung von *Per1*-mRNA in den RA-SFs, die auch in beiden Fällen signifikant ausfiel (Abb. 26).

Die Menge an detekterter *Per2*-mRNA war ebenso signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle, wenn die RA-SFs in IL-1 β oder TNF ausgesetzt waren (Abb. 26). Hier kam es im

Gegensatz zu *Per1* zu einer Verstärkung des anfänglichen Peaks. Sowohl IL-1 β als auch TNF führten hierbei zu einer fast doppelten mRNA-Menge im Vergleich zur Kontrolle. Nach zehn Stunden fiel die *Per2*-mRNA unter allen drei Bedingungen wieder auf den Ausgangswert ab (Abb. 26). Obwohl auch für *Per2* im weiteren Verlauf keine wirklichen Zunahmen der mRNA mehr erkennbar wurden, so lag das Level in den zytokinstimulierten Zellen stets höher als das in den Kontrollzellen.

Sowohl *Per3* als auch *Rev-Erb α* ließen relativ robuste Oszillationen über drei Zyklen erkennen, die jeweils nicht von TNF beeinflusst werden konnten (Abb. 27). *Per3*-mRNA wurde vermehrt vor allem zwischen 18 und 26 Stunden und zwischen 48 und 58 Stunden gefunden (Abb. 27). Der Verlauf der mRNA-Schwankungen von *Per3* in TNF-behandelten Zellen verlief grob wie der der Kontrolle. Nur anstelle des Plateaus zwischen 48 und 58 Stunden, ergab sich hier nur ein Maximum bei 50 Stunden. Wurden die Zellen mit IL-1 β stimuliert, kam es zu einer ausschließlich unter der Kontrolle verlaufenden Kurve, und es gab auch keine Phasen, in denen *Per3* für einen längeren Zeitraum in hohen Konzentrationen in den Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 27). Lediglich nach 20 und nach 54 Stunden waren kurze Maxima erkennbar.

Die Kurven von *Cry1* und *Cry2* verliefen relativ ähnlich. Bei beiden kam es bereits nach zwei Stunden zu einem deutlichen Anstieg der mRNA, der nach acht Stunden wieder auf ein niedriges Niveau abfiel (Abb. 27). Beide Anfangspeaks blieben durch IL-1 β ziemlich unbeeinflusst, wogegen TNF die jeweiligen Maxima um das 2- bis 3-fache steigerte (Abb. 27). Für *Cry1* konnte nach 24 Stunden noch ein Mal eine leichte Zunahme der mRNA festgestellt werden, der aber nur noch maximal den dreifachen Ausgangswert erreichte. Außerhalb dieser 24-Stundenrhythmisik wurde auch zum Zeitpunkt 18 Stunden ein kleines Maximum mit dem Wert 3,5 gefunden (Abb. 27). Unter IL-1 β -Einfluss wurde zwar anfangs der höchste Wert der Kontrolle nicht erreicht, dafür war aber im Verlauf der 72 Stunden meist mehr *Cry1*-mRNA in diesen RA-SFs nachweisbar. TNF konnte die Gesamt-mRNA über den Untersuchungszeitraum dann im Gegensatz zu IL-1 β signifikant steigern (Abb. 27). Zusätzlich zum verstärkten Anfangsspeak waren auch die Anstiege nach 26 und 50 Stunden ausgeprägter als in der Kontrolle.

TNF steigerte auch die Abundanz von *Cry2*-mRNA in den RA-SFs über 72 Stunden (Abb. 27). Diese lag bei IL-1 β teilweise unter und teilweise über den Werten der Kontrolle, und so kam es im gesamten Zeitraum zu keinen signifikanten Unterschieden. Neben der Zunahme der mRNA in den ersten Stunden wurden auch zu den Zeitpunkten 18, 50 56 und 66 Peaks gefunden. Deren Werte überschritten jedoch nicht einmal den doppelten Ausgangswert. Auch die TNF-stimulierten Zellen wiesen keine 24-Stunden-Rhythmisik auf (Abb. 27).

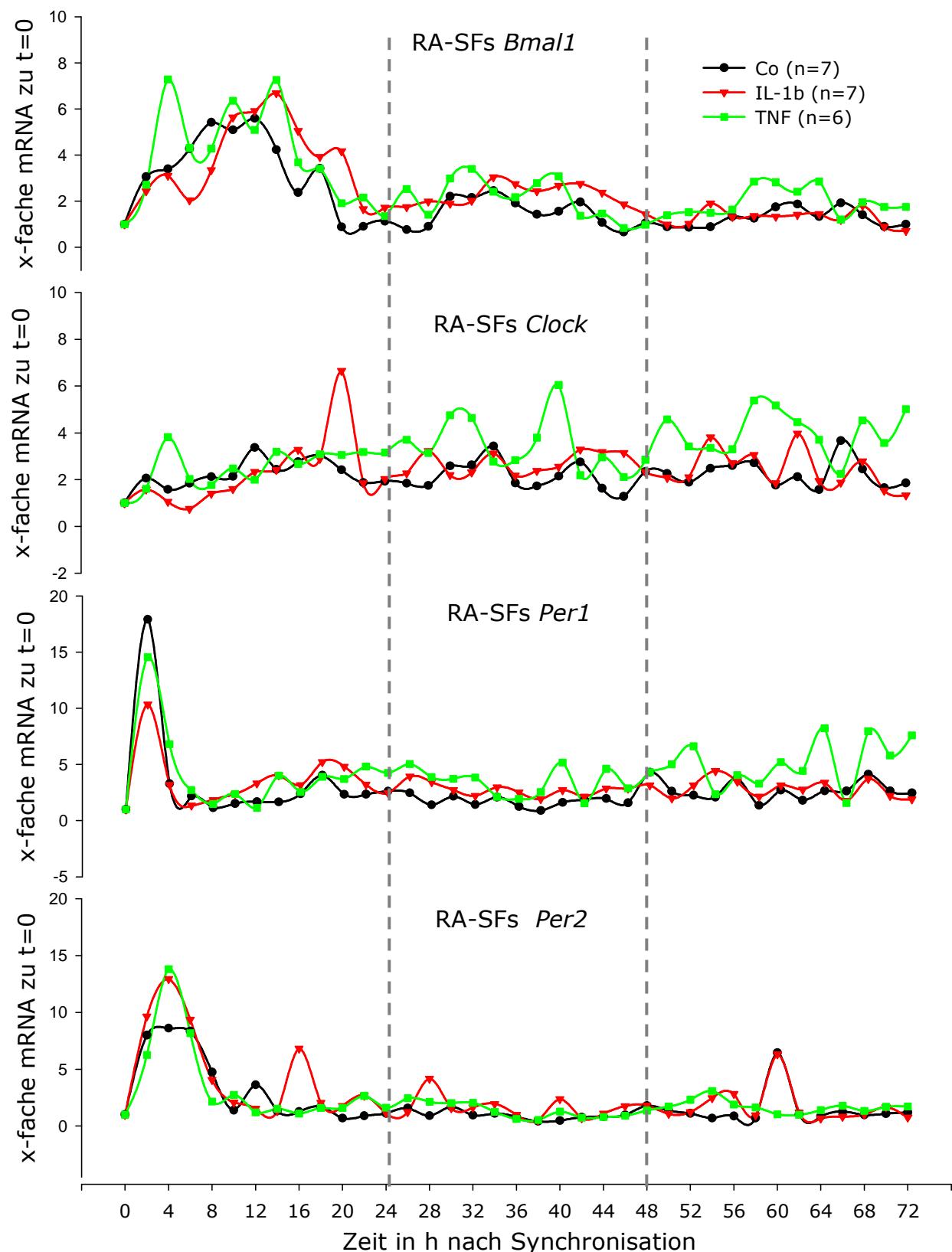


Abb. 26: Verlauf der Zu- und Abnahmen der UhrengemRNAs von *Bmal1*, *Clock*, *Per1* und *Per2* in RA-SFs unter Kontrollbedingungen (n=7) und unter Einfluss von IL-1 β (n=7) und TNF (n=6). Die Ergebnisse aller untersuchten primären Fibroblasten der verschiedenen RA-Patienten wurden gemittelt und die Werte der jeweiligen Zeitpunkte in Relation zum Ausgangswert ausgedrückt.

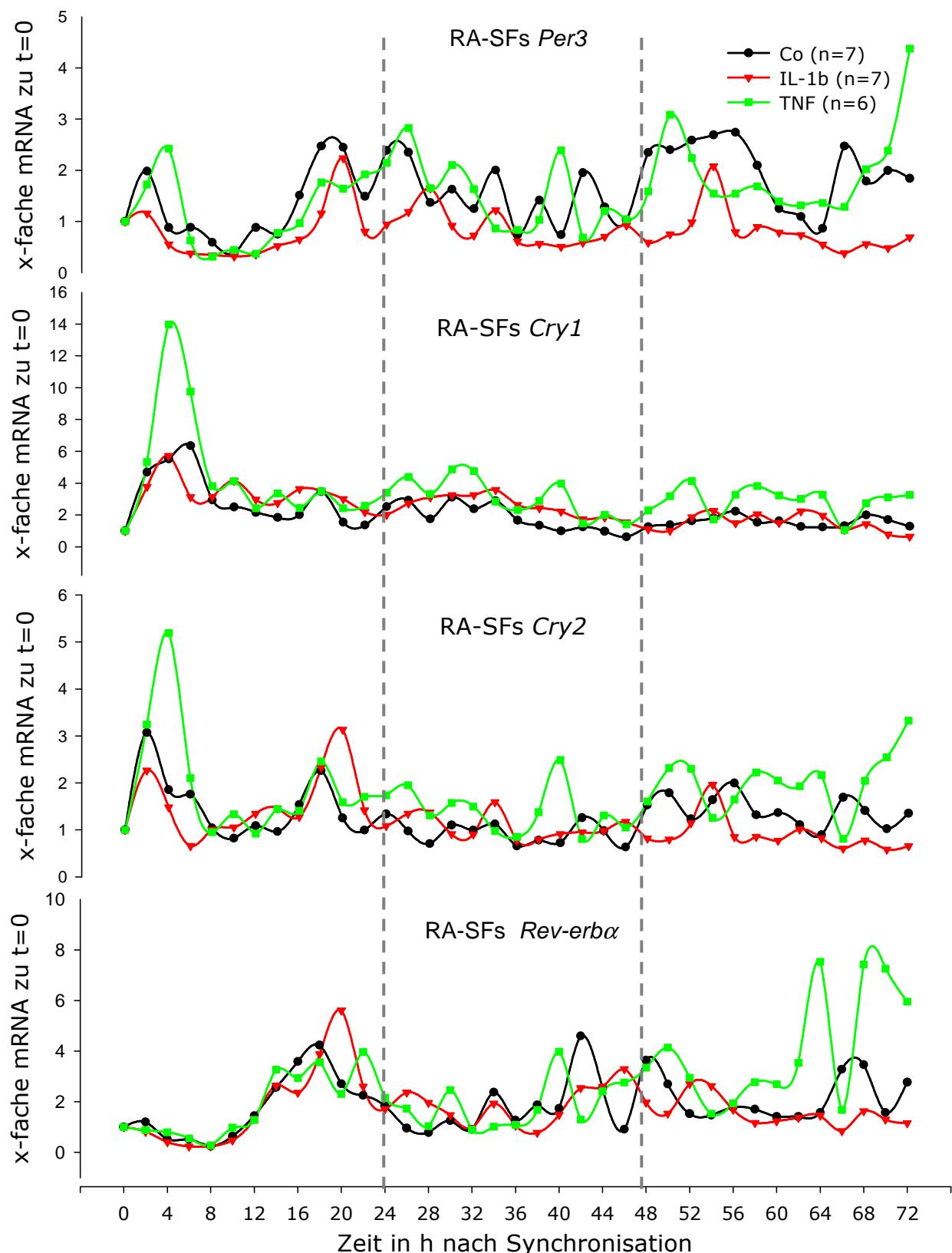


Abb. 27: Verlauf der Zu- und Abnahmen der UhrengemRNAs von *Per3*, *Cry2*, *Cry2* und *Rev-Erb α* in RA-SFs unter Kontrollbedingungen (n=7) und unter Einfluss von IL-1 β (n=7) und TNF (n=6). Die Ergebnisse aller untersuchten primären Fibroblasten der verschiedenen RA-Patienten wurden gemittelt und die Werte der jeweiligen Zeitpunkte in Relation zum Ausgangswert ausgedrückt.

Für *Rev-Erbα* ergaben sich in den ersten 24 Stunden kaum Unterschiede (Abb. 27). Lediglich die Maxima bei IL-1β wurden zwei Stunden und bei TNF vier Stunden später erreicht als in der Kontrolle. Ziemlich genau nach 24 Stunden wurde unter allen Bedingungen der zweite Scheitelwert erreicht. Ein dritter Zyklus war noch bei der Kontrolle und der TNF-Behandlung zu erkennen, bei IL-1β dagegen nicht (Abb. 27).

4.5 Effekte von IL-1β und TNF auf gesunde Kontrollfibroblasten (NFs)

Neben den synovialen Fibroblasten aus OA- und RA-Patienten wurden nun auch gesunde, nichtentzündliche Fibroblasten untersucht (Abb. 28 - Abb. 31).

Im Gegensatz zu der bei den OA-SFs und den RA-SFs vorgefundenen Situation wirkte sich TNF oder IL-1β kaum auf die Gesamt-mRNA-Expression im Verlauf von 72 Stunden aus (Abb. 28). IL-1β führte im Fall von *Bmal1* und *Per1* jeweils zu einer signifikanten Steigerung der detektierten mRNA in den Kontrollfibroblasten (Abb. 28). Alle weiteren Uhrengene wurden in ihrer Expression durch dieses Zytokin nicht bemerkenswert beeinflusst (Abb. 28). Des Weiteren führte TNF zu weniger *Clock*-mRNA und weniger *Rev-Erbα* im Untersuchungszeitraum. Die mRNA-Level von *Bmal1*, *Per1-3* und beiden Cryptochromen blieben durch TNF unbeeinträchtigt. (Abb. 28)

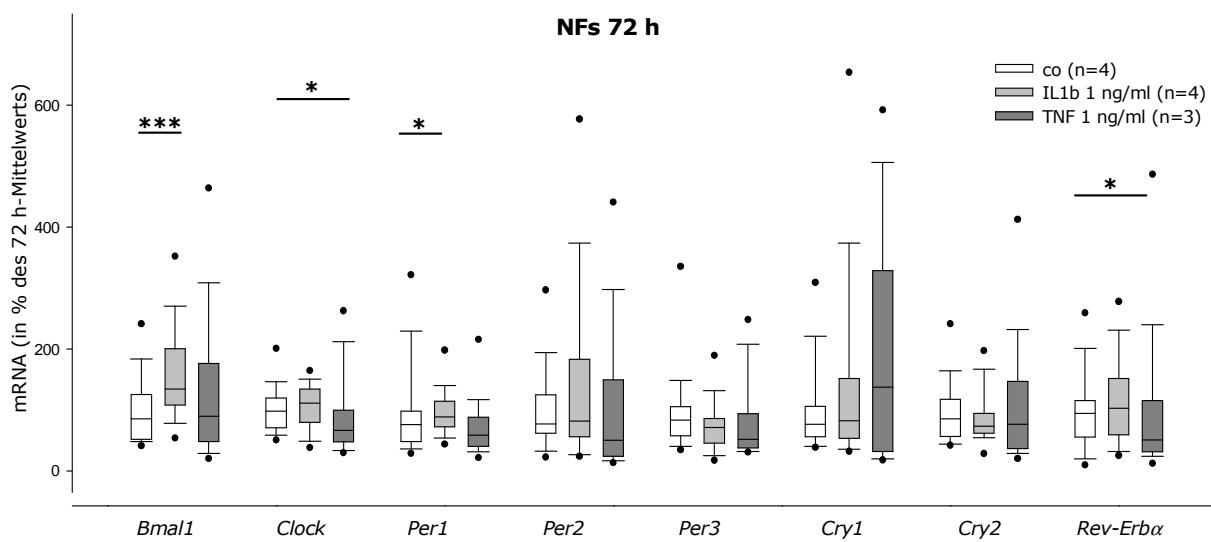


Abb. 28: Auswirkungen der Zytokine IL-1β (n=4) und TNF (n=3) auf die mRNA-Level der untersuchten Uhrengene im Vergleich zur Kontrolle (n=4) bei gesunden Fibroblasten (NFs). Die Box Plots stellen die Schwankungen um den Mittelwert der Kontrolle (Co) über 72 h dar. (* \triangleq p<0,05; *** \triangleq p < 0,001; Mann-Whitney Rank Sum Test)

In Bezug auf die detektierten *Cdc2*-mRNA-Level ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den OA-SFs. Es kam wieder nach ca. 20 Stunden zu einem enormen Anstieg von *Cdc2* in den Fibroblasten (Abb. 29). Bei den mit TNF behandelten Zellen wurde dabei ein weitaus höherer Scheitelwert erreicht als bei den Kontrollzellen oder den IL-1 β -behandelten NFs (Abb. 29). Im Vergleich zum Ausgangswert kletterte der Wert unter TNF-Einfluss auf 60 (Zeitpunkt t=32 Stunden), wogegen die Zellen unter Kontrollbedingungen oder unter IL-1 β -Einfluss 30 nicht überschritten (Abb. 29). Nach 36 Stunden fiel die *Cdc2*-Menge unter allen Bedingungen wieder deutlich ab. (Abb. 29)

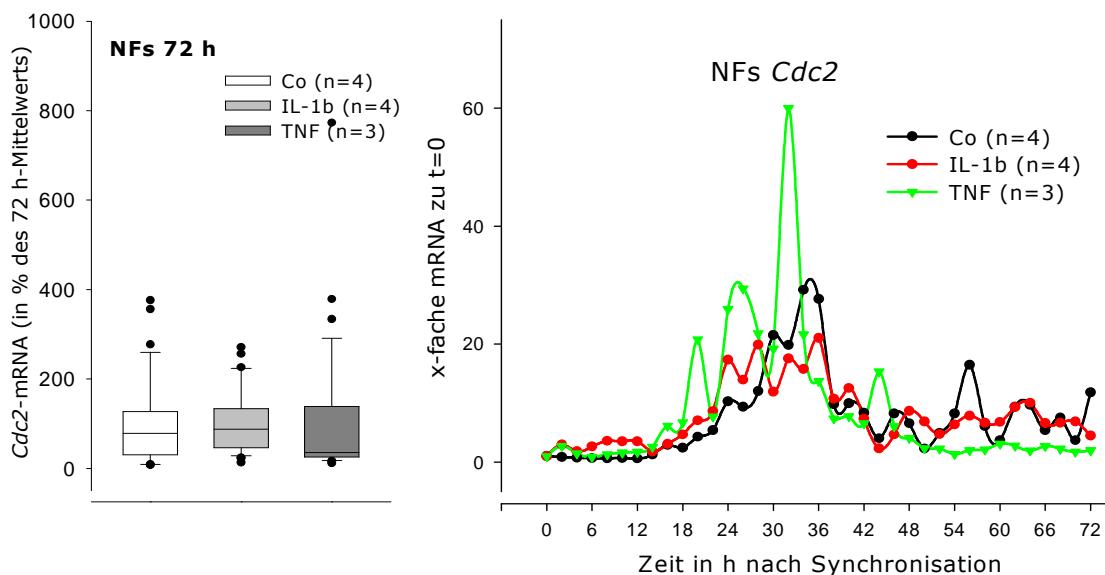


Abb. 29: Die *Cdc2*-Expression in NFs dargestellt als Schwankungen um den Mittelwert der Kontrolle (Co) in Box Plots und als Verlaufskurve der x-fachen mRNA-Menge im Vergleich zum Ausgangswert. Jeweils Vergleich der Kontrollbedingung (Co) (n=4) mit dem Einfluss von IL-1 β (n=4) und TNF (n=3) auf die Expression.
(Vergleich der Box Plots mittels Mann-Whitney Rank Sum Test)

Fast alle untersuchten Uhrengene zeigten weitaus weniger starke Schwankungen der mRNA innerhalb des Untersuchungszeitraums im Vergleich zu den Schwankungen bei OA-SFs und RA-SFs. *Bmal1* ließ zwar prinzipiell den gleichen Verlauf wie bei OA-SFs und RA-SFs erkennen, aber die mRNA erreichte nur noch maximal den vierfachen Ausgangswert und blieb somit unter den Werten der vorherig untersuchten Fibroblasten (Abb. 30). Trotzdem war die Oszillation von *Bmal1* über drei Zyklen sichtbar. Sowohl IL-1 β als auch TNF induzierten eine Oszillation mit gesteigerten Amplituden (Abb. 30). Dies war jedoch nur im Fall von IL-1 β signifikant. (Abb. 28) Für *Clock* ließen sich weder unter Kontrollbedingungen, noch in Anwesenheit von IL-1 β rhythmische Schwankungen im 72-Stunden-Verlauf feststellen (Abb. 30). TNF bewirkte eine Steigerung der *Clock*-mRNA während der ersten 18 Stunden, wogegen spätere Werte meist unter denen der Kontrolle blieben. (Abb. 30)

In den unbehandelten Fibroblasten war für *Per1* abermals der typische steile und kurze Anfangspeak erkennbar (Abb. 30). Während der restlichen Stunden wurden auch in NFs keine tagesrhythmischen Zu- und Abnahmen der mRNA deutlich. IL-1 β verringerte das Maximum im Vergleich zur Kontrolle, wogegen TNF diesen Wert erhöhte (Abb. 30). Trotz des niedrigeren Anfangspeaks verlief die Kurve der IL-1 β -Behandlung über ungefähr die Hälfte der 72 Stunden leicht oberhalb der Kurve der Kontrolle, was somit auch zu einem signifikanten Unterschied führte (Abb. 30).

Bei *Per2* war der Anstieg der mRNA nicht so steil und kurz wie der von *Per1* (Abb. 30). Die mRNA blieb über sechs Stunden hinweg im Vergleich zum Ausgangswert deutlich erhöht. Diese mRNA-Konzentration wurde durch TNF und IL-1 β gesteigert, wobei IL-1 β einen stärkeren Effekt hatte. Nach 24 Stunden stieg die *Per2*-mRNA in den zytokinbehandelten Zellen erneut an (Abb. 30). In der Kontrolle blieb dies aus. Die Zellen unter TNF-Einfluss verzeichneten einen weiteren kleinen Peak nach 44 Stunden und die Kontrollzellen einen nach 48 Stunden. Beide passten jedoch nicht ins Bild einer 24-Stunden-Rhythmik. (Abb. 30)

Für *Per3* waren keinerlei Oszillationen im Verlauf der 72 Stunden unter Kontrollbedingungen feststellbar (Abb. 31). Das Level für die mRNA stagnierte über 60 Stunden beinahe auf Ausgangsniveau, um anschließend etwas anzusteigen. Durch TNF wurden Schwankungen im 24-Stunden-Rhythmus über drei Zyklen ausgelöst (Abb. 31).

Bei *Cry1* kam es zu einer Zunahme der mRNA zwischen zwei und acht Stunden. Danach fiel die mRNA-Menge wieder ab und blieb auf Ausgangsniveau (Abb. 31). Erst in den letzten Stunden wurde wieder eine leichte Zunahme detektiert. IL-1 β führte dazu dass die *Cry1*-mRNA innerhalb der ersten Stunden beinahe doppelt so stark zunahm wie in der Kontrolle und dass diese erst nach 14 Stunden wieder auf den Anfangswert abfiel (Abb. 31). Der restliche Verlauf glich dem der Kontrolle. Über die nächsten 40 Stunden änderte sich dieser Wert kaum mehr, erst zum Zeitpunkt 56 Stunden war wieder eine leichte Zunahme detektierbar (Abb. 31). TNF bewirkte dagegen eine Vielzahl größerer Schwankungen der *Cry1*-mRNA-Menge die ohne erkennbare Rhythmik auftraten. Erst nach 48 Stunden waren keine Oszillationen mehr erkennbar (Abb. 31).

Die mRNA von *Cry2* stieg innerhalb der ersten Stunden nur gering an um anschließend wieder auf den Anfangswert abzufallen und dann, wie bereits bei *Cry1* und *Per3* beobachtet, bis ca. 60 Stunden beinahe unverändert blieb (Abb. 31). Beide Zytokine, IL-1 β und TNF, lösten auch hier mehrere Zyklen stärkerer mRNA-Schwankungen aus, die jedoch nach 48 Stunden nicht mehr erkennbar waren und sogar unter die Werte der Kontrolle fielen.

Auch die *Rev-Erb α* -mRNA zeigte ähnlich wie die von *Per3* keine wirklichen Oszillationen unter Kontrollbedingungen (Abb. 31). Anhand der Ergebnisse für OA-SFs und RA-SFs waren diese höchstens zu erahnen. Die Werte stagnierten über 60 Stunden hinweg ungefähr auf Ausgangsniveau und stiegen in den letzten Stunden des Untersuchungszeitraums leicht an. Beide Zytokine induzierten jedoch auch hier Oszillationen über drei Zyklen hinweg. Nach 48 Stunden waren keine deutlichen Schwingungen mehr erkennbar (Abb. 31).

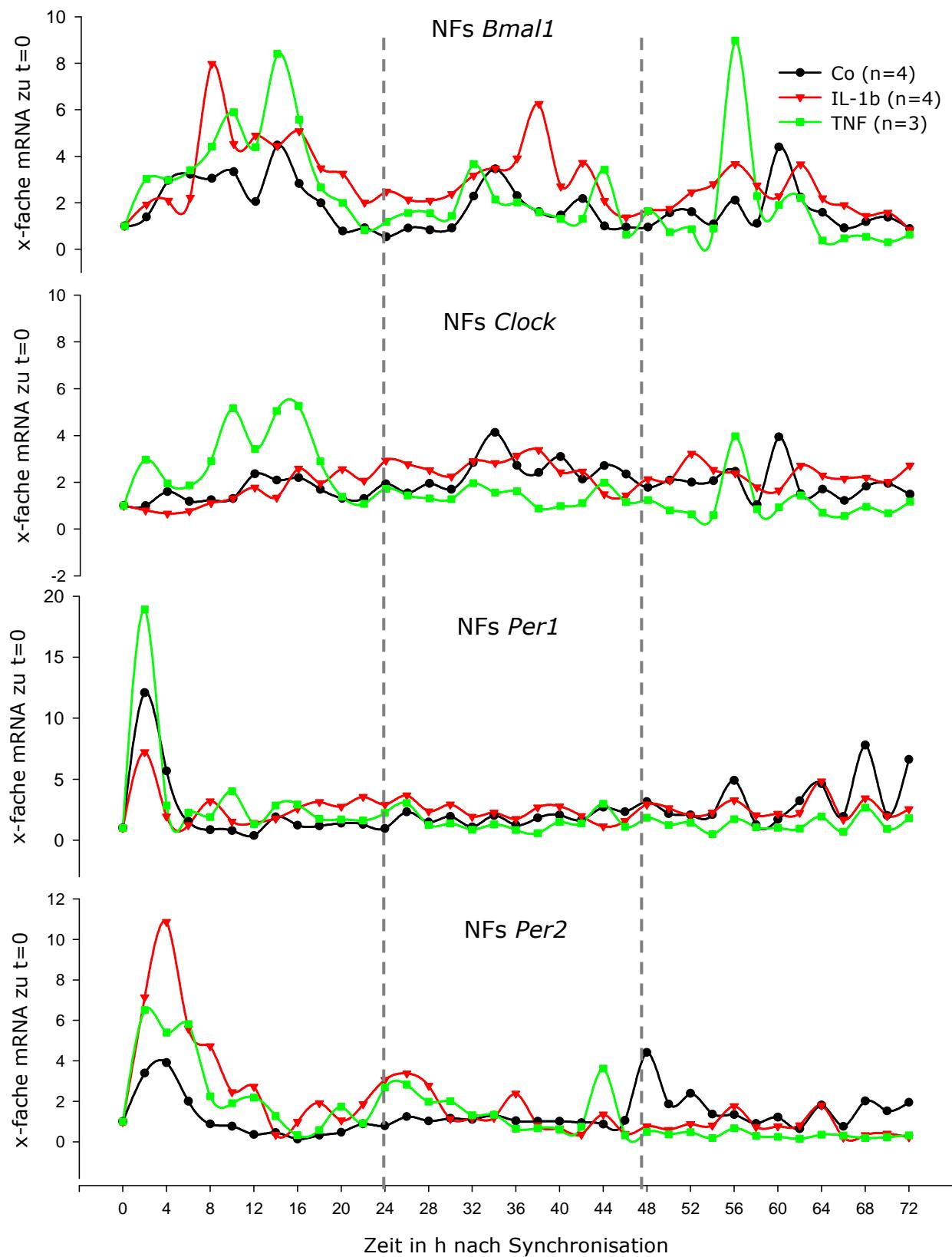


Abb. 30: Verlauf der Zu- und Abnahmen der UhrengemRNAs von *Bmal1*, *Clock*, *Per1* und *Per2* in gesunden Fibroblasten (NFs) unter Kontrollbedingungen (n=4) und unter Einfluss von IL-1 β (n=4) und TNF (n=3). Die Ergebnisse aller untersuchten primären Fibroblasten wurden gemittelt und die Werte der jeweiligen Zeitpunkte in Relation zum Ausgangswert ausgedrückt.

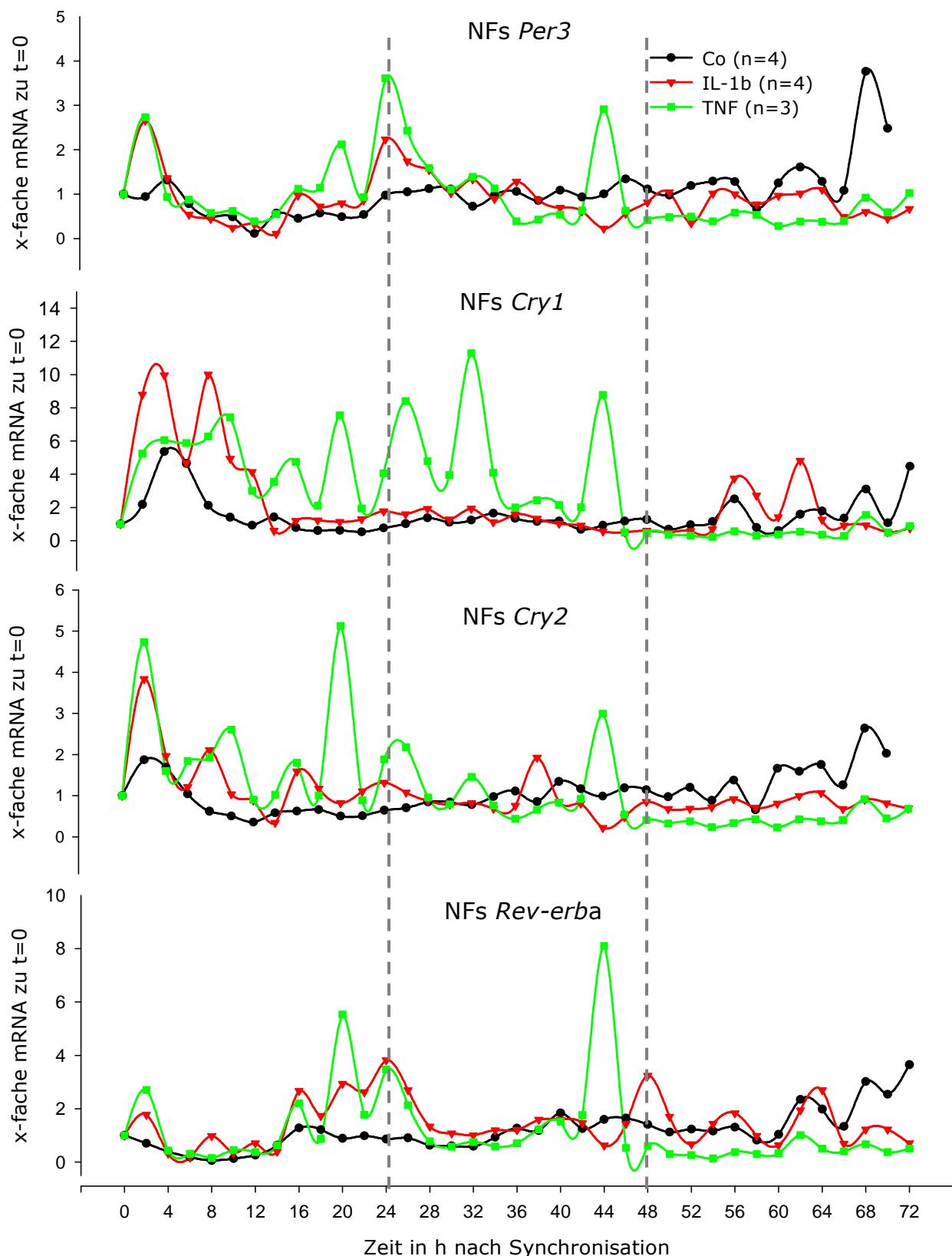


Abb. 31: Verlauf der Zu- und Abnahmen der Uhrengegen-mRNAs von *Bmal1*, *Clock*, *Per1* und *Per2* in gesunden Fibroblasten (NFs) unter Kontrollbedingungen (n=4) und unter Einfluss von IL-1 β (n=4) und TNF (n=3). Die Ergebnisse aller untersuchten primären Fibroblasten wurden gemittelt und die Werte der jeweiligen Zeitpunkte in Relation zum Ausgangswert ausgedrückt.

4.6 Etablierung der Western Blots für BMAL1, CLOCK und PER1

Zum Nachweis von BMAL1 wurde zunächst der bereits erfolgreich in der Immunofluoreszenz angewendete polyklonale Antikörper (Dianova, Hamburg) verwendet. Dieser Antikörper führte jedoch immer zu mehreren Banden im Western Blot. Neben der erwarteten Bande von 110 kDa wurde sowohl eine Bande > 135 kDa und mehrere Banden mit geringerem Molekulargewicht (ca. 80 kDa, 52 kDa, 34 kDa und < 30 kDa) auf dem Blot sichtbar (Abb. 32). Derartig viele Banden deuten eigentlich auf eine unspezifische Reaktivität des Antikörpers, zumindest im Western Blot, hin. Daraufhin wurde ein monoklonaler Antikörper (Abcam, USA) ausgetestet. Obwohl dieser in Kontrollversuchen mit BMAL1 in MH7A-Zellen entsprechend dem polyclonalen Antikörper nachwies, wurden keinerlei Banden im Western Blot sichtbar.

Der CLOCK-Nachweis ergab ein wesentlich saubereres Ergebnis mit kaum Hintergrund (Abb. 32). Trotzdem war auch hier neben der eigentlichen Bande von 101 kDa eine weitere im Bereich von ca. 60 kDa auf dem Blot zu erkennen. Dabei handelt es sich entweder um ein Abbauprodukt von CLOCK selbst oder um ein Epitop das zusätzlich noch auf einem anderen Protein vorhanden ist.

PER1 ergab für alle unterschiedlich aufgetragenen Proteinkonzentrationen eine relativ gleichstarke Bande von ca. 90-100 kDa (Abb. 32). Laut Hersteller sollte der Antikörper jedoch ein Protein der Größe 136 kDa erkennen. Auch im Bereich von 50-60 kDa war eine diffuse Belichtung des Films erkennbar.

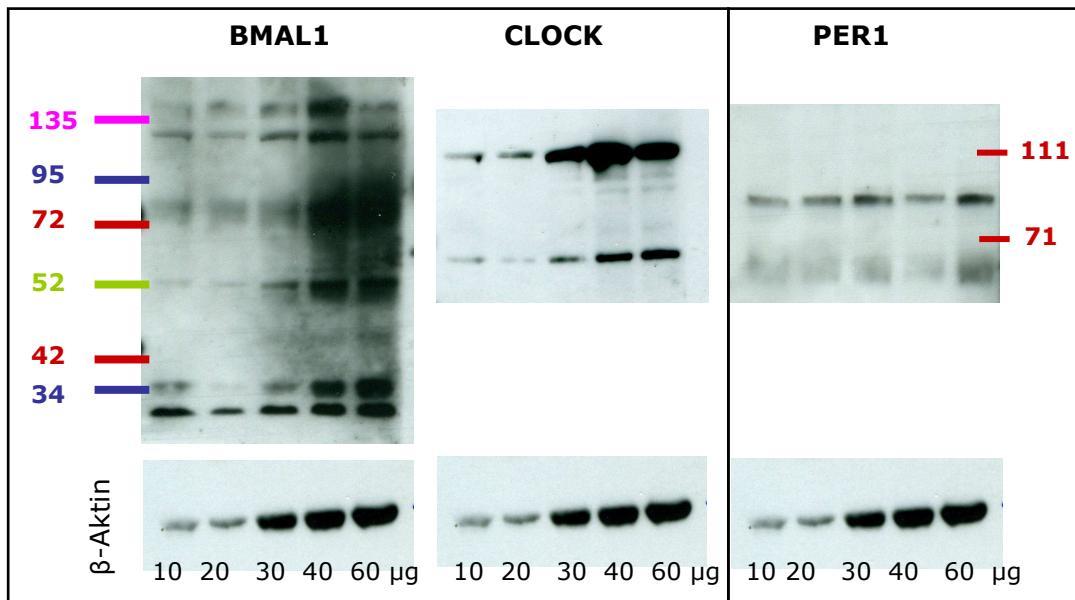


Abb. 32: Bandenmuster im Western Blot für BMAL1, CLOCK und PER1 bei unterschiedlichen Proteinmengen.

5 Diskussion

Der zirkadiane Rhythmus gewinnt in den letzten Jahren mehr und mehr an Bedeutung und Beachtung in der Wissenschaft. Eine Vielzahl physiologischer Prozesse in unserem Körper unterliegt einer tageszeitlichen Kontrolle, was am Schlaf-Wach-Rhythmus wohl am deutlichsten in Erscheinung tritt. Das moderne Leben fordert aber immer häufiger von uns, entgegen dieser ‚inneren Uhr‘ zu handeln. Negative Konsequenzen aus Schichtarbeit, häufigem Reisen zwischen verschiedenen Zeitzonen oder ständigem Schlafmangel sind als Schlafstörungen und Jetlag für jeden offensichtlich erkennbar. Aber ein gestörter zirkadianer Rhythmus scheint auch Einfluss auf viele andere Krankheitsbilder zu haben, die im ersten Moment weniger nahe liegend sind. So konnte z.B. auch schon gezeigt werden, dass Schichtarbeiter ein erhöhtes Risiko haben, an Krebs zu erkranken. (3)

Auch bei der RA gibt es eine zirkadiane Komponente. Neben den Symptomen wie Schmerz und Steifheit der Gelenke, die abhängig von der Tageszeit an Intensität zu- oder abnehmen, folgen auch die Plasmalevel proinflammatorischer Zytokine wie TNF oder IL-6 einer 24-Stunden-Rhythmik. Sie erreichen ihre Maximalwerte in den frühen Morgenstunden. (1;75) Cortisol ist ein stark antiinflammatorisches Glucocorticoid, das bei Entzündung ausgeschüttet wird. Bei RA-Patienten ist die Cortisolproduktion im Verhältnis zur vorherrschenden Entzündung jedoch zu niedrig, weshalb therapeutisch oft Prednisolon, ein synthetisches Glucocorticoid, verabreicht wird. (80) Der optimale Zeitpunkt für die Einnahme wäre dafür 2 Uhr nachts, um den ansteigenden Zytokinleveln im Blut entgegenzuwirken. (1) Da dies für die Patienten aber schwer praktikabel ist, wurde mittlerweile eine retardierte Prednisolontablette entwickelt, bei der die Wirksubstanz von einer Hülle umgeben ist und zeitverzögert freigesetzt wird. Gegen 22 Uhr eingenommen wird Prednisolon zum optimalen Zeitpunkt freigesetzt und kann so die zunehmende Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Blut begrenzen. Diese auf den passenden Zeitpunkt abgestimmte Medikation wird als Chronotherapie bezeichnet und hat sich bei der RA als wirksam erwiesen. (81;82)

Neben einer möglichen Beteiligung an der Pathogenese der RA oder deren Chronifizierung ist der zirkadiane Rhythmus also auch bei ihrer Therapie von großer Bedeutung.

Die RA manifestiert sich vor allem in einer Destruktion diarthrodialer Gelenke. Die entzündete Synovialmembran trägt zu dieser Zerstörung entscheidend bei. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob im Synovialgewebe ebenso eine molekulare Uhr existiert, wie sie bereits in vielen anderen Geweben nachgewiesen werden konnte. Zudem sollte der Einfluss der Entzündungsparameter IL-1 β und TNF auf die zirkadiane Rhythmik synovialer Fibroblasten untersucht werden, da eine gestörte Rhythmik zur Entartung der synovialen Fibroblasten maßgeblich beitragen könnte.

5.1 Keine Rhythmus im Synovialgewebe?

Wie bereits für viele andere Gewebe- und Zelltypen nachgewiesen werden konnte, weist auch das Synovialgewebe eine molekulare Uhr auf. Abgesehen von einem höheren Prozentsatz BMAL1-positiver Zellen innerhalb des ersten Zeitintervalls, waren keine weiteren Unterschiede in Anzahl der BMAL1- bzw. PER1-positiven Zellen zwischen RA-, OA- und Traumapatienten zwischen 7 Uhr morgens und 17 Uhr feststellbar.

Dass es innerhalb einer Patientengruppe keine Unterschiede zu den jeweiligen Tageszeiten gab, kann daran liegen, dass der Zeitraum von zehn Stunden innerhalb derer die Operationen stattfanden, zu kurz ist, um stärkere Schwankungen auf Proteinebene per Immunfluoreszenz nachweisen zu können.

Eine weitere Einschränkung ist die geringe Verfügbarkeit von nichtentzündlichem Synovialgewebe aus Traumapatienten. Die entnommenen Gewebeproben sind außerdem sehr klein und ermöglichen es oft nicht, mehrere Kryoschnitte anzufertigen oder die gewünschte Anzahl von Gesichtsfeldern auszuzählen. Sie sind somit vielleicht nur eingeschränkt repräsentativ für die Kontrollgruppe.

In anderen Studien wird daher meist auf OA-Gewebe zu Vergleichszwecken zurückgegriffen. Hier ging man ursprünglich davon aus, dass OA im Gegensatz zu RA eine weniger stark entzündliche Gelenkerkrankung ist, sondern vor allem eine Verschleißerscheinung der Gelenke. Eine Theorie zur Entstehung der OA hält die Krankheit primär für einen fehlgeschlagenen Versuch durch Überbelastung ausgelösten Verschleiß des Gelenks zu reparieren, was sekundär zu einer Entzündung führt. (70) Andere dagegen sehen eine lokale Entzündung als möglichen Auslöser für die Krankheit. Bereits in einem frühen Stadium der OA kann eine Synovitis mit synovialer Hypertrophie und Hyperplasie sowie infiltrierenden Immunzellen nachgewiesen werden. (46;83) OA-Gewebe stellt deshalb aufgrund seiner guten Verfügbarkeit zwar eine praktische Alternative zum Synovialgewebe von Traumapatienten dar, ist aber sicherlich nur unter Vorbehalt als Kontrolle verwendbar.

Bei der Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurde die Anzahl positiv auf BMAL1 bzw. PER1 gefärbter Zellen berücksichtigt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass eine gewisse basale Proteinmenge von BMAL1 oder PER1 ständig in der Zelle vorhanden ist, und die subzelluläre Lokalisation der Proteine die eigentliche Rolle für die Transkriptionsaktivierung bzw. -hemmung spielt. So zeigte z.B. Kwon et al. (84), dass BMAL1 und CLOCK zu jeder Zeit in NIH 3T3-Fibroblasten detektierbar sind, sich deren Verteilung zwischen Zytoplasma und Kern jedoch je nach Zeitpunkt unterscheidet. Auch für CLOCK im SCN oder zusammen mit PER1 in der Leber von Mäusen konnte gezeigt werden, dass nur die subzelluläre Verteilung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt variiert, das Protein an sich aber stets vorhanden

ist. (18;20) Daraus lässt sich schließen, dass nicht die bloße Anwesenheit der Uhrenproteine für die 24-Stunden-Rhythmus verantwortlich ist, sondern es vielmehr auf das Zusammenspiel von Transkription, posttranslationalen Modifikationen und auch der Translokation der Proteine in den Kern ankommt.

Die bisher bestuntersuchte posttranskriptionale Modifikation der Uhrenproteine ist wahrscheinlich die Phosphorylierung durch Casein kinase I ϵ (CKI ϵ) und Casein kinase I δ (CKI δ). Die CKI phosphoryliert Periods, Cryptochrome und BMAL1. Durch die Phosphorylierung der PERs wird einerseits der Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System der Zelle ermöglicht. (85) Andererseits ist sie auch die Voraussetzung für Interaktionen von PERs und CRYs. Hier scheint das phosphorylierte PER nötig zu sein, um CRY zu binden und anschließend als PER-CRY-CKI-Komplex in den Kern transportiert zu werden. (24;86-89) Gegenspieler der Kinasen sind Phosphatasen wie PPI oder PP5, die Phosphatgruppen wieder vom Molekül entfernen. (86;90)

Mutationen verdeutlichen die zentrale Rolle der Phosphorylierung bei der Regulation des zirkadianen Rhythmus. Beim Menschen wird die Krankheit FASPS (*familial advanced sleep phase syndrome*) entweder durch eine Mutation von CKI δ ausgelöst oder durch die Mutation der Stelle von PER2 die durch CKI phosphoryliert wird. FASPS ist erblich und manifestiert sich darin, dass die betroffenen Personen bereits gegen 19.30 Uhr schlafen gehen und gegen 4.30 Uhr wieder aufstehen. Ihr Rhythmus ist im Vergleich zu Normalpersonen ca. um 4 Stunden vorgezogen. (91;92)

5.2 Blutzellen zeigen keine Synchronizität

Die gesunde Synovialmembran besteht vor allem aus zwei Zelltypen: Den Makrophagen-ähnlichen Typ A Synoviozyten und die Fibroblasten-ähnlichen Typ B Synoviozyten. Im Verlauf der Synovitis kommt es zur Infiltration einer Vielzahl von Immunzellen aus dem Blut. (45) Diese Zellen könnten also zum einen die Rhythmus der eigentlichen Synoviozyten bei OA- und RA-Patienten kaschieren oder könnten zum anderen selbst die betroffenen Zellen darstellen, die in der Krankheit einen atypischen zirkadianen Rhythmus aufweisen. Deshalb sollte im nächsten Schritt die Rhythmus der Blutzellen, zunächst von gesunden Personen und anschließend die von Arthritispatienten, untersucht und verglichen werden.

In einem ersten Experiment wurde das Blut von vier Probanden untersucht. Es ist bekannt, dass die Anzahl der verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen im Blutstrom je nach Tageszeit variiert. So ist z.B. der Anteil naiver, zytotoxischer T-Zellen oder naiver T-Helferzellen im Blut nachts wesentlich höher als tagsüber. Dagegen werden am Tag mehr natürliche Killer-Zellen im Blut vorgefunden als während der Nacht. (93;94) Um zu

verhindern, dass mögliche Unterschiede der detektierten mRNA-Mengen verschiedener Uhrentypen rein auf die veränderte Zusammensetzung der Gesamtleukozyten im Tagesverlauf basieren, wurde den Probanden nur ein Mal morgens Blut abgenommen und dieses bis zur RNA-Isolation zum jeweiligen Zeitpunkt im Brutschrank aufbewahrt. Auch wenn nicht auszuschließen ist, dass sich Untergruppen der Blutzellen unterschiedlich tolerant gegenüber den Kulturbedingungen zeigen, sollte diese Störgröße jedoch bei allen Probanden ähnlich sein und somit das Ergebnis nicht wesentlich verfälschen.

Boivin et al. zeigten in einer Studie mit drei Männern, dass die mRNAs aller drei Perioden in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) im 24-Stunden-Rhythmus oszillierten. Allerdings wurden dabei bereits interindividuelle Unterschiede deutlich. (95) Die Analyse der Expressionsprofile unserer Untersuchung ergab ebenfalls große Unterschiede zwischen den vier Probanden. Überraschenderweise wurde neben dem erwarteten antiphasischen Anstieg von *Bmal1* und *Per1* auch noch bei zwei der vier Probanden ein simultaner Anstieg dieser beiden Uhrentypen-mRNAs beobachtet. Dieses Phänomen konnten Teboul et al. ebenfalls beobachten und haben daraufhin den Begriff der Chronotypen eingeführt. (96) Diese zwei Chronotypen sind aber nicht gleichzusetzen mit den oft verwendeten Begriffen der ‚Lerchen‘ und der ‚Eulen‘. Als Lerchen werden solche Personen bezeichnet die generell früh aufstehen und früh zu Bett gehen, wogegen die Eulen eher spät ins Bett gehen und lange schlafen. (97) Die Probanden, die an der Studie von Teboul et al. teilnahmen, unterzogen sich einer zweiwöchigen Synchronisationsphase, in der sie zu definierten Zeitpunkten aßen und zu vorgegebenen Zeiten schliefen. Variierende Schlaf-Wach-Rhythmen konnten somit als Ursache der Chronotypen ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurden in dieser Studie nur männliche Probanden eingeschlossen, um mögliche Auswirkungen hormoneller Schwankungen auf die Expression der Uhrentypen zu vermeiden. Somit ist weder das Geschlecht noch der Zyklus der Frau ursächlich für dieses Phänomen. Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten solch strenge Regularien nicht umgesetzt werden. Es wurde nur eine Befragung zum üblichen Schlafrhythmus durchgeführt, die aber keine wesentlichen Unterschiede in Bezug auf Zubettgehnzeit oder Schlafdauer aufdeckte.

Schwankungen der mRNA-Menge in den Zellen gehen nur selten einher mit den gleichen Veränderungen auf Proteinebene. Neben der Stabilität der mRNA spielen auch weitere Regulationsmechanismen wie posttranskriptionale Modifikationen und im Fall der Uhrentypen auch die subzelluläre Lokalisation eine entscheidende Rolle, ob die vorhandene mRNA über das entsprechende Protein letztendlich eine Wirkung entfaltet. (86;98) Deshalb wurden im nächsten Schritt die Uhrentypen BMAL1, CLOCK, PER1 und PER2 in Leukozyten angefärbt, um die Rhythmisierung der Blutzellen auf Proteinebene verfolgen zu können. Hierbei war die Zusammensetzung aus unterschiedlichen Subpopulationen der Leukozyten nicht von Bedeutung, weshalb zu jedem Zeitpunkt erneut Blut abgenommen wurde. Außerdem wurde so sichergestellt, dass im Blut etwaig vorhandene humorale

Faktoren, die sich auf die Rhythmik der Blutzellen auswirken, diesen Einfluss auch ausüben konnten.

Über 24 Stunden hinweg wurden alle vier Stunden Blutproben entnommen und die enthaltenen Leukozyten angefärbt. Entgegen der Erwartungen war in keiner der Untergruppen (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten) eine deutliche Zu- oder Abnahme eines der Uhrenproteine BMAL1, CLOCK, PER1 oder PER2 erkennbar. Des Weiteren konnten auch keine Veränderungen der Lokalisation innerhalb der Zellen, wie eine Translokation aus dem Zytoplasma in den Kern, festgestellt werden. Um hier ebenfalls auszuschließen, dass dieses Ergebnis darauf zurückzuführen war, dass die Probandin während des Untersuchungszeitraums nicht geschlafen hat oder dass die vorgefundene Arrhythmie zyklusbedingt war, wurde das Experiment mit zwei Frauen und zwei Männern wiederholt. Auch bei der Wiederholung ergab sich das gleiche Bild einer Vielzahl unsynchroner Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten im Tagesverlauf.

Diese Ergebnisse zeigten klar, dass die Blutzellen in ihrer Gesamtheit betrachtet nicht synchronisiert vorliegen. Möglicherweise mag dies für spezielle Subpopulationen der Fall sein. So ist es denkbar, dass z. B. alle B-Zellen oder alle neutrophilen Granulozyten einen synchronisierten, zirkadianen Rhythmus besitzen. Arjona A. et al konnten bereits nachweisen, dass die natürlichen Killerzellen in der Milz der Ratte sowohl die Uhrentypen rhythmisch exprimieren, als auch ihre zytolytischen Enzyme Granzym B und Perforin abhängig von der Tageszeit produzieren. (99) Die natürlichen Killerzellen die in dieser Studie verwendet wurden, wurden jedoch alle aus der Milz isoliert und nicht aus dem zirkulierenden Blut. Diese Zellen befanden sich alle zur selben Zeit im selben Organ und waren somit auch den gleichen lokalen Faktoren ausgesetzt, die vielleicht eine Synchronisation bewirken können. Dafür spricht auch die Studie von Keller M. et al, in der die Rhythmik von Milz, Lymphknoten und Peritonealmakrophagen der Maus untersucht wurden. Für alle drei Entnahmestellen wurden zirkadiane Schwankungen der mPer2- und mRev-Erbα-mRNA festgestellt. Die Phasen von Milz, Lymphknoten und Bauchfellmakrophagen unterschieden sich jedoch. (100)

Zirkulierende Blutzellen kommen aufgrund ihrer ständigen Ortsveränderungen mit unterschiedlichen Synchronisatoren in unterschiedlichen Organen in Berührung und stellen somit eine heterogene Zellpopulation unterschiedlicher Rhythmik dar. Die Substanzen, die im Körper Zellen und Gewebe synchronisieren können, werden derzeit noch diskutiert. Es gibt immer mehr Hinweise, dass Glucocorticoide eine dieser Substanzgruppen ist. (39;40) Welche weiteren Moleküle dazu in der Lage sind, ist noch Gegenstand der Forschung.

Doppelfärbungen gegen Uhrenproteine und zelltypische Marker wurden nicht durchgeführt. Da sowohl Lymphozyten als auch Monozyten ständig aus dem Blut in das entzündete

Synovialgewebe einwandern, liegen zwangsläufig auch dort unterschiedlich synchronisierte Zellen vor. Wahrscheinlich gibt es daher *in situ* keine Rhythmik.

Die Tatsache, dass außerdem mindestens zwei verschiedene Chronotypen in Bezug auf die Expressionsprofile der Uhrengene existieren, disqualifiziert Blut als mögliches diagnostisches Mittel, gestörte zirkadiane Rhythmen nachzuweisen.

5.3 Zytokine beeinträchtigen die Rhythmik der Zelllinie MH7A

Die Zelllinie MH7A ermöglichte es im Gegensatz zum Synovialgewebe der Patienten einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden zu verfolgen. Anfängliche Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass diese Zelllinie zwar die Uhrenproteine besitzt, dass sich die einzelnen Zellen jedoch in Bezug auf deren subzelluläre Verteilung stark unterscheiden. Um die Zellen zu synchronisieren, wurden sie 48 Stunden ohne FCS kultiviert. Die anschließenden Immunfluoreszenzfärbungen belegten eine einheitliche Lokalisation der Uhrenproteine innerhalb der Zellen. Weitere Möglichkeiten Zellen zu synchronisieren sind unter anderem ein Serumschock, die Applikation von Endothelin-1 oder Forskolin. (101-103)

Nach dem Aushungern wiesen die MH7A-Zellen eine Oszillation der Uhrengene-mRNAs auf. Die Zugabe von IL-1 β oder TNF (jeweils 1 ng/ml) führte zu stark verringerten mRNA-Mengen der jeweiligen Uhrengene und zu einer Abflachung derer Amplituden. Auch Cavadini et al. konnten eine starke Hemmung der Expression von *Per1*, *Per2*, und *Per3* durch Applikation von TNF (10 ng/ml) bei NIH 3T3-Fibroblasten zeigen, *Bmal1*- und *Clock*-Expression blieb dagegen unbeeinflusst. (102) Cavadini et al. postulieren eine hemmende Wirkung von TNF über die E-Boxen in den Uhrengene-promotoren, da sie zwar für die mPers verringerte mRNA-Level nachgewiesen haben, nicht jedoch für *mBmal1* und *mClock*, in deren Promotoren keine E-Boxen gefunden wurden. Mit Hilfe der Genomatix-Software (Genomatix, München) konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass der humane *Bmal1*-Promotor im Gegensatz zu dem der Maus eine E-Box besitzt. (104) Der humane *Clock*-Promotor besitzt sogar zwei E-Boxen. (105) Wir konnten jedoch trotz vorhandener E-Boxen keinerlei Hemmung der *Bmal1*-mRNA bei der Zelllinie MH7A oder den Kontrollfibroblasten feststellen. (Abb. 15; Abb. 28) Nur bei den OA-SFs war eine Hemmung von *Bmal1* und *Clock* durch TNF erkennbar. (Abb. 20) Bei RA-SFs dagegen wurde die mRNA beider Uhrengene durch TNF sogar deutlich gesteigert. IL-1 β hatte keinen Einfluss auf deren Expression. (Abb. 24) Rein aufgrund der Tatsache, dass E-Boxen in den Promotoren von *Bmal1* und *Clock* beim Menschen existieren, kann zwar noch nicht schlussgefolgert werden, dass diese auch funktionell sind, auszuschließen ist es aktuell aber ebenfalls nicht. Über welchen

Mechanismus TNF oder auch IL-1 β ihre Wirkung auf die Uhrengene expression entfalten, muss noch geklärt werden.

5.4 Dosisabhängige Hemmung der Uhrengene durch IL-1 β und TNF

Die durchgeführten Dosis-Wirkungskurven für IL-1 β und TNF führte zu dem überraschenden Ergebnis, dass die niedrigste Konzentration des jeweiligen Zytokins die Menge der Uhrengene-mRNAs in MH7As am stärksten beeinträchtigte, was auch eine Wiederholung des Experiments bestätigte. (Abb. 17)

Es wurde bereits beschrieben, dass die Zelllinie MH7A im Gegensatz zu primären, synovialen Fibroblasten von OA- und RA-Patienten IL-6 auch ohne äußeren Stimulus produziert. Durch Zugabe von IL-1 β wird dessen Produktion dosisabhängig gesteigert, wobei der maximale Effekt mit 1 ng/ml erreicht wurde. (106) Unsere Dosis-Wirkungskurve wurde deshalb in einem Bereich von 1 pg/ml bis 1 ng/ml durchgeführt. Die IL-6- und IL-8-Produktion wurde bereits bei 100 pg/ml bzw. 10 pg/ml maximal gesteigert, was wahrscheinlich durch die hohe Basisproduktion dieser beiden Zytokine zustande kommt.

Für die Beobachtung, dass die niedrigste IL-1 β -Konzentration von 1 pg/ml zur maximalen Verringerung einiger Uhrengene-mRNAs führte, ist es schwierig eine Erklärung zu finden. Generell ist es nicht ungewöhnlich, dass niedrige Stoffmengen einen stärkeren Effekt haben können als hohe. Als Beispiel sei hier das adrenerge System genannt. Die α - und β -Rezeptoren dieses Systems vermitteln entgegengesetzte Wirkungen, wobei beide durch Noradrenalin aktiviert werden können. (107) In niedrigen Konzentrationen ($< 10^{-7}$ M) wird nur der α -Rezeptor durch Noradrenalin gebunden. In höheren Konzentrationen werden dagegen beide Rezeptoren gebunden, was dazu führen kann, dass sich die Effekte gegenseitig aufheben. (108) Sowohl TNF als auch IL-1 β können jeweils an zwei verschiedene Rezeptoren binden. TNF entfaltet seine biologischen Wirkungen hauptsächlich über TNF-RI. TNF-RII findet man zwar hauptsächlich auf Immunzellen, wird aber auch von synovialen Fibroblasten produziert. (60;61;109) Auch IL-1 β kann an zwei verschiedene Rezeptoren binden. Allerdings gilt hier IL-1R Typ II als biologisch inaktive Form. (60;62;63) Es besteht des Weiteren noch die Möglichkeit, dass ein anderes Molekül *downstream* im Aktivierungsprozess über zwei Rezeptoren zu einer Minderung des Effekts führt. IL-6, das durch TNF und IL-1 β induziert wird, kann dabei ausgeschlossen werden, da synoviale Fibroblasten weder den membrangebundenen IL-6R besitzen, noch dessen lösliche Form sezernieren. (67)

Was letztendlich ursächlich für diese indirekt-proportionale Dosis-Wirkungskurve ist, bedarf der Klärung in weiteren Experimenten.

5.5 Zytokine beeinträchtigen die Rhythmik primärer Fibroblasten

Die gesunden Fibroblasten (NFs) reagierten auf die Zytokine IL-1 β und TNF prinzipiell mit einer Steigerung der Uhrenexpressions. Die Auswertung mittels Box Plots ergab hier zwar nur selten signifikante Unterschiede, diese wurden jedoch anhand der Kurvenverläufe der jeweiligen mRNA-Abundanzen deutlicher. Die Amplituden erreichten höhere Maxima als unter Kontrollbedingungen, besonders die Werte der negativen Regulatoren innerhalb der ersten Stunden. Die Induktion von *Per1* wird generell als *Resetting*-Signal betrachtet. Dieser durch einen Zeitgeber induzierte Anstieg führt dann zu einer Phasenveränderung des Rhythmus. Je nachdem zu welchem Zeitpunkt *Per1* ansteigt, kommt es zu einer Verkürzung oder zu einer Verlängerung der aktuellen Phase. (110) Auch *Cry1* und *Cry2* wurden in ihrer Expression deutlich gesteigert. Hier kam es allerdings zu starken, ultradianen Oszillationen während der ersten 48 Stunden. Diese Schwingungen zeigten keine regelmäßige Rhythmik. TNF scheint sich hier also maßgeblich auf die Expression der Crys auszuwirken. Ob dies über direkte Effekte, wie z.B. über die E-Boxen in den jeweiligen Promotoren, oder über indirekte Zustände kommt, ist aktuell nicht bekannt. (102) Dass sich diese Rhythmik aber nicht auf die übrigen Uhrenkomponenten auswirkte, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass wie bereits postuliert, die Oszillation der Cry-mRNA für eine funktionierende Uhr nicht notwendig ist. Des Weiteren wurde auch schon beschrieben, dass nicht einmal eine rhythmische Expression der CRY-Proteine nötig ist, den Zyklus der molekularen Uhr aufrecht zu erhalten. (111) Vielmehr kommt es auf posttranskriptionale Modifikationen und den zeitlich koordinierten Transport in den Zellkern an. (10)

Generell zeigten die NFs im Vergleich zu den OA-SFs und RA-SFs eine schwächere Oszillation unter Kontrollbedingungen. Vor allem bei *Per3* und *Rev-Erbα*, die bei den anderen Zellen eine relativ robuste Oszillation zeigten, war kaum eine Rhythmik erkennbar. Eine mögliche Ursache ist, dass drei der vier Fibroblastenpopulationen bereits stickstoffgelagert wurden, was aufgrund der schlechten Verfügbarkeit nichtentzündlichen Synovialgewebes unumgänglich war. Die Zellen hatten jeweils schon vier Passagierungen hinter sich und wiesen deshalb eventuell schon Seneszenzerscheinungen auf. Eine gedämpfte Rhythmik wird allgemein mit dem Alterungsprozess in Verbindung gebracht. (112-114)

Bei den OA-SFs waren für alle Uhrenen außer den Crys Oszillationen induzierbar, die über drei Zyklen erkennbar waren, wenn auch teilweise mit abnehmender Amplitude. Auch hier kam es anfangs zu steilen Zunahmen der *Per1*- und *Per2*-mRNA, die einen *Bmal1*-Anstieg

zur Folge hatten. Die positiven und negativen Regulatoren der molekularen Uhr wurden also wie erwartet antiphasisch exprimiert. TNF bewirkte durchgehend eine Reduzierung aller Uhrengegen-mRNAs im Vergleich zur Kontrolle, wobei sogar die normal prominenten Anfangspeak von *Per1* und *Per2*, kaum mehr feststellbar waren. Die hemmende Wirkung von IL-1 β auf die Uhrengegenexpression war geringer als die von TNF, führte aber ebenfalls zu stark verringerten Ausgangspeak von *Per1* und *Per2*. Die OA-SFs reagierten genau entgegengesetzt auf die proinflammatorischen Zytokine wie die NFs und zeigten nicht wie diese die typischen, steilen Anfangspeak von *Per1* und *Per2*.

Das *Resetting* bzw. die Feinststeuerung der molekularen Uhr aufgrund äußerer Faktoren geht immer einher mit einer Zunahme der *Per1*- und *Per2*-Transkription. (10;40) Je nachdem wann die beiden *Pers* ansteigen, haben sie unterschiedliche Wirkungen auf die Phasenverschiebung des Rhythmus. Sie können das Zeitintervall verkürzen, verlängern oder kaum einen Einfluss darauf haben. Werden die *Pers* induziert während die Menge der PER-Proteine in der Zelle bereits wieder abnimmt, kommt es zu einer verlängerten Phase. Dagegen verkürzt sich die Phase wenn *Pers* bei einer zunehmenden Proteinmenge induziert werden.

Dass die OA-SFs in Gegenwart von IL-1 β und TNF nicht diese charakteristischen Anfangspeak für *Per1* und *Per2* zeigten, könnte ein Zeichen für eine Desensibilisierung gegenüber diesen Zytokinen sein. In späten Osteoarthrosestadien werden auch hier im Gelenk erhöhte Zytokinspiegel gefunden, die jedoch noch immer unter den Zytokin-Konzentrationen bei RA-Patienten liegen. (46;74) Die Operationen bei denen die OA-Patienten eine Endoprothese des Kniegelenks bekommen, werden erst in einem späten Stadium durchgeführt. Da alle unsere Zellen aus solchen OPs stammten, ist davon auszugehen, dass diese OA-SFs bereits seit längerem erhöhten Zytokinleveln im arthritischen Gelenk ausgesetzt waren und somit die Zytokine nicht mehr als akuten Stimulus wahrnehmen bzw. einfach nicht mehr auf ihn reagieren können. Die Entzündungsreaktion ist ein Prozess, der eine akute Infektion innerhalb kurzer Zeit bekämpfen soll. Dieser Prozess erfordert viel Energie. (115) Bei der OA kommt es aber zu einer Chronifizierung des Entzündungsprozesses. Die OA-SFs sind auf der Dauer nicht in der Lage die Ressourcen dafür zur Verfügung zu stellen und reagieren deshalb nicht mehr auf die Entzündungsmediatoren.

Die RA-SFs zeigten keine verminderte Reaktivität gegenüber TNF oder IL-1 β . Da die Amplituden der ausgelösten Schwingungen jedoch schon unter Kontrollbedingungen höher waren als bei den NFs, war deren Steigerung durch die Zytokine nicht mehr ganz so stark ausgeprägt. Von den RA-SFs ist seit langem bekannt, dass sich ihr Phänotyp von dem gesunder synovialer Fibroblasten unterscheidet. Sie liegen in der RA-Synovialmembran in einer aktivierte Form vor, die sich durch eine abgerundete Morphologie und einen langen Zellkern bereits erkennen lässt. (49) Außerdem verhalten sich RA-SFs aggressiv und

invadieren in das umliegende Gewebe. Dieses Verhalten wird nicht durch die Zytokine ausgelöst, sondern ist eine Eigenschaft der RA-SFs. (49) Oft werden RA-SFs mit Tumorzellen verglichen, die sich ebenfalls durch eine erhöhte Proliferationsrate und das Einwandern in andere Gewebe auszeichnen. (48;109) Um dies zu ermöglichen, produzieren sie vermehrt Enzyme, die die extrazelluläre Matrix (EZM) degradieren, wie z.B. Matrix-Metalloproteasen (MMPs) oder Kathepsine. (116-118)

Eine funktionierende molekulare Uhr ermöglicht es der Zelle, den Zellmetabolismus hochzuregulieren und so in eine aktivierte Form überzugehen. Man weiß heute, dass zwischen 2 und 10 % des Transkriptoms einer Zelle einer zirkadianen Rhythmik unterliegen, wobei hier die meisten Gene nicht zu den Uhrengegenen selbst zählen, sondern CCGs (*clock controlled genes*) sind. Je nach Gewebe unterscheiden sich die induzierten CCGs deutlich. (8;119;120) Über solche CCGs steuert die molekulare Uhr auch Prozesse wie den Zellmetabolismus und den Zellzyklus. (121;122) Ohne eine funktionierende molekulare Uhr wäre es der Zelle also kaum möglich, derartig aktiviert zu werden.

Bei den RA-SFs scheint der Mechanismus der molekularen Uhr prinzipiell also nicht gestört zu sein, da sie wie die NFs noch auf die Stimuli IL-1 β und TNF reagieren. Auch RA-SFs sind im Gelenk ständig Zytokinen ausgesetzt, zeigen hier aber keine Zeichen der Desensibilisierung wie die OA-SFs. Eine mögliche Ursache hierfür wäre die tumorartige Entartung der RA-SFs, die einhergeht mit einer Aktivierung der Zellen und einer erhöhten Mitoserate. Diese wiederum könnte die Folge einer gesteigerten Induktion von CCGs sein, da RA-SFs höhere Amplituden der Uhrengegenexpression im Vergleich zu NFs aufweisen.

Das Gen *Cdc2* kodiert die cyclinabhängige Kinase 1 (CDK1) in eukaryotischen Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Mitose einnimmt. Diese Kinase erlaubt den Übergang der Zelle von der G2- in die M-Phase des Zellzyklus und ist dadurch entscheidend für die Zellteilung. (123). Die *Cdc2*-mRNA wird verstärkt exprimiert, wenn sich die Zelle auf eine Teilung vorbereitet. In unserem Fall diente die *Cdc2*-mRNA zum einen als Indikator für die Proliferation der Fibroblasten und sollte außerdem verdeutlichen, dass die Oszillationen der Uhrengegen-mRNAs nicht aufgrund unterschiedlicher Stadien während des Zellzyklus zustande kamen. Bei den OA-SFs und den NFs steigt die *Cdc2*-mRNA nach ca. 20 Stunden stark an und fällt nach ca. 40 Stunden wieder auf Ausgangsniveau ab. Man kann also indirekt darauf schließen, dass während dieses Zeitintervalls ein Zellteilungszyklus stattgefunden hat. Beim Vergleich der Verlaufskurven wird auch deutlich, dass zwischen Zellteilung und Oszillation der Uhrengegen-mRNAs kein Zusammenhang besteht.

Es wird oft beschrieben, dass sowohl TNF als auch IL-1 β auf Fibroblasten proliferationsfördernd wirken. (124-126) Sowohl OA-SFs als auch NFs durchliefen während des Untersuchungszeitraums jeweils einen Mitosezyklus. IL-1 β bewirkte keinerlei Veränderung in Bezug auf die *Cdc2*-mRNA. Die Zellteilung fand nicht früher statt als in den

Kontrollzellen und es kam auch zu keiner weiteren Mitose während der 72 Stunden. Obwohl TNF teilweise zu erhöhten *Cdc2*-Leveln führte, hatte dies keinen Einfluss auf die Proliferation.

Bei den RA-SFs ergab sich von vornehmerein ein anderes Bild als bei den OA-SFs oder den NFs. Hier konnte zwar ebenfalls eine Zunahme der *Cdc2*-mRNA ab der 20. Stunde beobachtet werden, anders aber als bei NFs und OA-SFs kam es anschließend zu keiner länger währenden Absenkung der *Cdc2*-Konzentration. Gegen 46 bzw. 48 Stunden nahm unter allen drei Bedingungen die *Cdc2*-Menge kurzfristig ab, um danach aber direkt wieder anzusteigen, was auf eine zweite Proliferation der Zellen hinweist, und somit die Annahmen bestätigt, dass sich RA-SFs durch eine erhöhte Mitoserate auszeichnen.

Die Verdickung der Synovialmembran bei RA kommt zum einen durch die infiltrierenden Immunzellen zustande, zum anderen tragen aber auch die synovialen Fibroblasten dazu bei. Es ist daher immer wieder Gegenstand der Diskussion, ob eine gesteigerte Proliferationsrate der RA-SFs für die Verdickung ursächlich ist. Dass *c-Myc* in RA-SFs überexprimiert ist und dessen Hemmung das Wachstum der Zellen verringert, spricht jedenfalls für diese Hypothese. (49;127;128) In anderen Studien wurde bei RA-SFs im Vergleich zu OA-SFs keine gesteigerte Proliferationsrate festgestellt. (129-131) Selbst wenn die *Cdc2*-mRNA-Menge auch keinen direkten Nachweis für eine Zellteilung darstellt, so implizieren unsere Ergebnisse doch, dass es zu einer gesteigerten Mitoserate in RA-SFs kommt.

5.6 Uhrenproteine im Western Blot

Alle drei untersuchten Uhrenproteine BMAL1, CLOCK und PER1 ergaben im Western Blot keine einzelnen vorhergesagten Banden. Wenn auch bei CLOCK eine Bande mit der entsprechenden Größe von ca. 101 kDa detektierbar war, so wurde zusätzlich noch eine weitere, kleine Bande auf der Höhe von ca. 60-65 kDa vom Antikörper sichtbar gemacht. Bei PER1 war keine Bande nachweisbar, die der Gesamtgröße des Proteins von 136 kDa entsprach. Dafür waren zwei Banden der Größe 90-100 kDa und ca. 60 kDa detektierbar. Möglicherweise handelt es sich hier um Isoformen von PER1. Chilov et al. fanden bereits in der Maus mehrere PER1-Isoformen, die sich in ihrer Größe unterschieden und in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden konnten. (132) Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten ebenfalls nur PER1-Banden von geringerer Masse als 136 kDa nachweisen. (133)

Für BMAL1 zeigten sich im Western Blot eine Vielzahl von Banden unterschiedlicher Größe. Auch für dieses Protein wurden bereits mehrere Isoformen beschrieben, deren Vorkommen teilweise auch abhängig vom Typ des untersuchten Gewebes war. (134)

Für verschiedene Uhrenproteine gibt es also verschiedene Splicevarianten, die wiederum in unterschiedlichen Geweben vorkommen. Die Etablierung des Western Blots für BMAL1, CLOCK und PER1 in MH7A-Zellen gibt bereits einen Einblick in diese Verteilung.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Straub RH, Cutolo M. Circadian rhythms in rheumatoid arthritis: implications for pathophysiology and therapeutic management. *Arthritis Rheum* 2007; 56:399-408.
- (2) Daan S. A history of chronobiological concepts. In: Albrecht U, editor. *The circadian clock*. Springer; 2010. Seiten 1-36.
- (3) Bechtold DA, Gibbs JE, Loudon AS. Circadian dysfunction in disease. *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31:191-8.
- (4) Fu L, Lee CC. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:350-61.
- (5) Schibler U, Sassone-Corsi P. A web of circadian pacemakers. *Cell* 2002; 111:919-22.
- (6) Challet E. Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 2007; 148:5648-55.
- (7) Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 2002; 295:1070-3.
- (8) Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418:935-41.
- (9) Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M et al. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 2000; 288:682-5.
- (10) Reppert SM, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:647-76.
- (11) Okamura H. Clock genes in cell clocks: roles, actions, and mysteries. *J Biol Rhythms* 2004; 19:388-99.
- (12) Gachon F, Nagoshi E, Brown SA, Ripperger J, Schibler U. The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma* 2004; 113:103-12.
- (13) Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 2004; 43:527-37.
- (14) Guillaumont F, Dardente H, Giguere V, Cermakian N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* 2005; 20:391-403.
- (15) Balsalobre A. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res* 2002; 309:193-9.
- (16) Asher G, Schibler U. A CLOCK-less clock. *Trends Cell Biol* 2006; 16:547-9.

- (17) Shi S, Hida A, McGuinness OP, Wasserman DH, Yamazaki S, Johnson CH. Circadian clock gene Bmal1 is not essential; functional replacement with its paralog, Bmal2. *Curr Biol* 2010; 20:316-21.
- (18) Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 2001; 107:855-67.
- (19) Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U et al. The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 2002; 110:251-60.
- (20) Kondratov RV, Chernov MV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Gudkov AV, Antoch MP. BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. *Genes Dev* 2003; 17:1921-32.
- (21) Hirayama J, Sahar S, Grimaldi B, Tamaru T, Takamatsu K, Nakahata Y et al. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature* 2007; 450:1086-90.
- (22) Zhang J, Dong X, Fujimoto Y, Okamura H. Molecular signals of Mammalian circadian clock. *Kobe J Med Sci* 2004; 50:101-9.
- (23) Hirayama J, Sassone-Corsi P. Structural and functional features of transcription factors controlling the circadian clock. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15:548-56.
- (24) Eide EJ, Vielhaber EL, Hinz WA, Virshup DM. The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem* 2002; 277:17248-54.
- (25) Pfeffer M, Muller CM, Mordel J, Meissl H, Ansari N, Deller T et al. The mammalian molecular clockwork controls rhythmic expression of its own input pathway components. *J Neurosci* 2009; 29:6114-23.
- (26) Langmesser S, Tallone T, Bordon A, Rusconi S, Albrecht U. Interaction of circadian clock proteins PER2 and CRY with BMAL1 and CLOCK. *BMC Mol Biol* 2008; 9:41.
- (27) Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 2000; 288:1013-9.
- (28) Cashmore AR. Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell* 2003; 114:537-43.
- (29) Duez H, Staels B. Rev-erb alpha gives a time cue to metabolism. *FEBS Lett* 2008; 582:19-25.
- (30) Yin L, Wu N, Lazar MA. Nuclear receptor Rev-erbalpha: a heme receptor that coordinates circadian rhythm and metabolism. *Nucl Recept Signal* 2010; 8.
- (31) Guillaumont F, Teboul M. [Heme as a ligand of REVERB alpha and beta nuclear receptors]. *Med Sci (Paris)* 2008; 24:572-4.
- (32) Hannibal J. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res* 2002; 309:73-88.

- (33) Mikkelsen JD, Larsen PJ, Mick G, Vrang N, Ebling FJ, Maywood ES et al. Gating of retinal inputs through the suprachiasmatic nucleus: role of excitatory neurotransmission. *Neurochem Int* 1995; 27:263-72.
- (34) Reghunandanan V, Reghunandanan R. Neurotransmitters of the suprachiasmatic nuclei. *J Circadian Rhythms* 2006; 4:2.
- (35) Roenneberg T, Merrow M. The circadian system of cells. In: Vinod Kumar, editor. *Biological Rhythms*. Springer Verlag; 2002. Seiten 60-70.
- (36) Ginty DD, Kornhauser JM, Thompson MA, Bading H, Mayo KE, Takahashi JS et al. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* 1993; 260:238-41.
- (37) Ding JM, Faiman LE, Hurst WJ, Kuriashkina LR, Gillette MU. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J Neurosci* 1997; 17:667-75.
- (38) Kalsbeek A, Palm IF, La Fleur SE, Scheer FA, Perreau-Lenz S, Ruiter M et al. SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms* 2006; 21:458-69.
- (39) Balsalobre A, Marcacci L, Schibler U. Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr Biol* 2000; 10:1291-4.
- (40) Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM et al. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 2000; 289:2344-7.
- (41) Damiola F, Le MN, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 2000; 14:2950-61.
- (42) Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 2001; 291:490-3.
- (43) Imboden JB. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol* 2009; 4:417-34.
- (44) Visser H. Early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005; 19:55-72.
- (45) Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol* 2000; 63:17-31.
- (46) Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Eklem Hastalik Cerrahisi* 2010; 21:2-14.
- (47) Tarner IH, Harle P, Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005; 19:19-35.
- (48) Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423:356-61.
- (49) Pap T, Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000; 2:361-7.
- (50) Oliver JE, Silman AJ. Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Res Ther* 2009; 11:252-60.

- (51) Müller-Ladner U, Gay S. Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis. In: Straub RH, editor. Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen. Vandenhoeck & Rupprecht; 2007. Seiten 70-9.
- (52) Märker-Hermann E, Mayet WJ, Schwarting A. Rheumatologie / Immunologie. In: Lehnert H, Werdan K, editors. Innere Medizin. Thieme; 2006. Seiten 778-86.
- (53) Quinn MA, Emery P. Are early arthritis clinics necessary? Best Pract Res Clin Rheumatol 2005; 19:1-17.
- (54) van Roon JA, Bijlsma JW, Lafeber FP. Diversity of regulatory T cells to control arthritis. Best Pract Res Clin Rheumatol 2006; 20:897-913.
- (55) Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. Nat Med 2007; 13:139-45.
- (56) Dinarello CA, Mantovani A. GP. Cytokines: a world apart? In: Mantovani A DCGP, editor. Pharmacology of Cytokines. Oxford University Press; 2000.
- (57) Mallerich P ED. Introduction to TNF / pathophysiology of TNF. In: Weinberg JM, Buchholz R, editors. TNF-alpha Inhibitors. New York: Birkhäuser; 2006. Seiten 1-8.
- (58) Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol 1996; 14:397-440.
- (59) Maini RN. The role of tumor necrosis factor in rheumatoid arthritis. In: van den Berg WB MP, editor. Cytokines and joint injury. Berlin: Birkhäuser; 2004. Seiten 1-28.
- (60) Abbas AK, Lichtmann AH, Pillai S. Cytokines. In: Abbas AK, Lichtmann AH, Pillai S, editors. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. Seiten 267-302.
- (61) Bahia MS, Silakari O. Tumor necrosis factor alpha converting enzyme: an encouraging target for various inflammatory disorders. Chem Biol Drug Des 2010; 75:415-43.
- (62) Dinarello CA. Biology of interleukin 1. FASEB J 1988; 2:108-15.
- (63) Goldbach-Mansky R. Blocking interleukin-1 in rheumatic diseases. Ann N Y Acad Sci 2009; 1182:111-23.
- (64) Dinarello CA. The biology of interleukin 1 and comparison to tumor necrosis factor. Immunol Lett 1987; 16:227-31.
- (65) Dinarello CA. The IL-1 family: The role of IL-1 and IL-18 in inflammation. In: van den Berg WB MP, editor. Cytokines and joint injury. Birkhäuser; 2004. Seiten 29-67.
- (66) Arvidson NG, Gudbjornsson B, Elfman L, Ryden AC, Totterman TH, Hallgren R. Circadian rhythm of serum interleukin-6 in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1994; 53:521-4.
- (67) Cronstein BN. Interleukin-6-a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. Bull NYU Hosp Jt Dis 2007; 65 Suppl 1:S11-S15.
- (68) Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. Nat Clin Pract Rheumatol 2006; 2:619-26.

- (69) Deon D, Ahmed S, Tai K, Scaletta N, Herrero C, Lee IH et al. Cross-talk between IL-1 and IL-6 signaling pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Immunol* 2001; 167:5395-403.
- (70) Brandt KD, Dieppe P, Radin E. Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Med Clin North Am* 2009; 93:1-24.
- (71) Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med* 2010; 26:355-69.
- (72) Goldring SR. The role of bone in osteoarthritis pathogenesis. *Rheum Dis Clin North Am* 2008; 34:561-71.
- (73) Cawston TE. The role of proteinases in joint tissue destruction. In: van den Berg WB MP, editor. *Cytokines and joint injury*. Berlin: Birkhäuser; 2004. Seiten 189-220.
- (74) Michael JW, Schluter-Brust KU, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107:152-62.
- (75) Cutolo M, Straub RH, Buttgereit F. Circadian rhythms of nocturnal hormones in rheumatoid arthritis: translation from bench to bedside. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:905-8.
- (76) Davis S, Mirick DK, Stevens RG. Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1557-62.
- (77) Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I et al. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1563-8.
- (78) Miyazawa K, Mori A, Okudaira H. Establishment and characterization of a novel human rheumatoid fibroblast-like synoviocyte line, MH7A, immortalized with SV40 T antigen. *J Biochem* 1998; 124:1153-62.
- (79) Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 1999; 270:41-9.
- (80) Straub RH, Cutolo M. Further evidence for insufficient hypothalamic-pituitary-glandular axes in polymyalgia rheumatica. *J Rheumatol* 2006; 33:1219-23.
- (81) Buttgereit F, Doering G, Schaeffler A, Witte S, Sierakowski S, Gromnica-Ihle E et al. Targeting pathophysiological rhythms: prednisone chronotherapy shows sustained efficacy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1275-80.
- (82) Jacobs JW, Bijlsma JW. Modified release prednisone in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1257-9.
- (83) Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:1263-7.
- (84) Kwon I, Lee J, Chang SH, Jung NC, Lee BJ, Son GH et al. BMAL1 shuttling controls transactivation and degradation of the CLOCK/BMAL1 heterodimer. *Mol Cell Biol* 2006; 26:7318-30.
- (85) Gatfield D, Schibler U. Physiology. Proteasomes keep the circadian clock ticking. *Science* 2007; 316:1135-6.

- (86) Gallego M, Virshup DM. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:139-48.
- (87) Virshup DM, Eide EJ, Forger DB, Gallego M, Harnish EV. Reversible protein phosphorylation regulates circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2007; 72:413-20.
- (88) Eide EJ, Kang H, Crapo S, Gallego M, Virshup DM. Casein kinase I in the mammalian circadian clock. *Methods Enzymol* 2005; 393:408-18.
- (89) Akashi M, Tsuchiya Y, Yoshino T, Nishida E. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol Cell Biol* 2002; 22:1693-703.
- (90) Partch CL, Shields KF, Thompson CL, Selby CP, Sancar A. Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:10467-72.
- (91) Jones CR, Campbell SS, Zone SE, Cooper F, DeSano A, Murphy PJ et al. Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat Med* 1999; 5:1062-5.
- (92) Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM et al. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 2001; 291:1040-3.
- (93) Lange T, Dimitrov S, Born J. Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1193:48-59.
- (94) Bollinger T, Bollinger A, Skrum L, Dimitrov S, Lange T, Solbach W. Sleep-dependent activity of T cells and regulatory T cells. *Clin Exp Immunol* 2009; 155:231-8.
- (95) Boivin DB, James FO, Wu A, Cho-Park PF, Xiong H, Sun ZS. Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 2003; 102:4143-5.
- (96) Teboul M, Barrat-Petit MA, Li XM, Claustre B, Formento JL, Delaunay F et al. Atypical patterns of circadian clock gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Mol Med* 2005; 83:693-9.
- (97) Phillips ML. Circadian rhythms: Of owls, larks and alarm clocks. *Nature* 2009; 458(7235):Seiten 142-4.
- (98) Staiger D, Koster T. Spotlight on post-transcriptional control in the circadian system. *Cell Mol Life Sci* 2010.
- (99) Arjona A, Sarkar DK. Evidence supporting a circadian control of natural killer cell function. *Brain Behav Immun* 2006; 20:469-76.
- (100) Keller M, Mazuch J, Abraham U, Eom GD, Herzog ED, Volk HD et al. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:21407-12.
- (101) Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 1998; 93:929-37.

- (102) Cavadini G, Petrzilka S, Kohler P, Jud C, Tobler I, Birchler T et al. TNF-alpha suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:12843-8.
- (103) Yagita K, Tamanini F, van Der Horst GT, Okamura H. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* 2001; 292:278-81.
- (104) Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005; 21:2933-42.
- (105) Tabuchi A, Sakaya H, Kisukeda T, Fushiki H, Tsuda M. Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP-responsive element-binding protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I. *J Biol Chem* 2002; 277:35920-31.
- (106) Miyazawa K, Mori A, Yamamoto K, Okudaira H. Transcriptional roles of CCAAT/enhancer binding protein-beta, nuclear factor-kappaB, and C-promoter binding factor 1 in interleukin (IL)-1beta-induced IL-6 synthesis by human rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Biol Chem* 1998; 273:7620-7.
- (107) Jänig W. Transmitter und ihre Rezeptoren im Sympathikus und Parasympathikus. In: Schmidt, Lang, Thews, editors. *Physiologie des Menschen*. 29 ed. Heidelberg: Springer; 2005. Seiten 430-3.
- (108) Miller LE, Justen HP, Scholmerich J, Straub RH. 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; 14:2097-107.
- (109) Ritchlin C. Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res* 2000; 2:356-60.
- (110) Murphy BA, Vick MM, Sessions DR, Cook RF, Fitzgerald BP. Acute systemic inflammation transiently synchronizes clock gene expression in equine peripheral blood. *Brain Behav Immun* 2007; 21:467-76.
- (111) Fan Y, Hida A, Anderson DA, Izumo M, Johnson CH. Cycling of CRYPTOCHROME proteins is not necessary for circadian-clock function in mammalian fibroblasts. *Curr Biol* 2007; 17:1091-100.
- (112) Dijk DJ, Duffy JF, Czeisler CA. Contribution of circadian physiology and sleep homeostasis to age-related changes in human sleep. *Chronobiol Int* 2000; 17:285-311.
- (113) Duffy JF, Czeisler CA. Age-related change in the relationship between circadian period, circadian phase, and diurnal preference in humans. *Neurosci Lett* 2002; 318:117-20.
- (114) Roenneberg T, Merrow M. Entrainment of the human circadian clock. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2007; 72:293-9.
- (115) Straub RH, Cutolo M, Buttigereit F, Pongratz G. Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. *J Intern Med* 2010; 267:543-60.
- (116) Müller-Ladner U, Gay S. MMPs and rheumatoid synovial fibroblasts: Siamese twins in joint destruction? *Ann Rheum Dis* 2002; 61:957-9.

- (117) Hummel KM, Petrow PK, Franz JK, Muller-Ladner U, Aicher WK, Gay RE et al. Cysteine proteinase cathepsin K mRNA is expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis and is detected at sites of synovial bone destruction. *J Rheumatol* 1998; 25:1887-94.
- (118) Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:223-8.
- (119) Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG et al. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* 2002; 12:540-50.
- (120) Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 2002; 109:307-20.
- (121) Walisser JA, Bradfield CA. A time to divide: does the circadian clock control cell cycle? *Dev Cell* 2006; 10:539-40.
- (122) Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol* 2007; 195:187-98.
- (123) Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:21-32.
- (124) Postlethwaite AE, Lachman LB, Kang AH. Induction of fibroblast proliferation by interleukin-1 derived from human monocytic leukemia cells. *Arthritis Rheum* 1984; 27:995-1001.
- (125) Dukovich M, Severin JM, White SJ, Yamazaki S, Mizel SB. Stimulation of fibroblast proliferation and prostaglandin production by purified recombinant murine interleukin 1. *Clin Immunol Immunopathol* 1986; 38:381-9.
- (126) Gitter BD, Labus JM, Lees SL, Scheetz ME. Characteristics of human synovial fibroblast activation by IL-1 beta and TNF alpha. *Immunology* 1989; 66:196-200.
- (127) Hashiramoto A, Sano H, Maekawa T, Kawahito Y, Kimura S, Kusaka Y et al. C-myc antisense oligodeoxynucleotides can induce apoptosis and down-regulate Fas expression in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum* 1999; 42:954-62.
- (128) Qu Z, Garcia CH, O'Rourke LM, Planck SR, Kohli M, Rosenbaum JT. Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining. *Arthritis Rheum* 1994; 37:212-20.
- (129) Aicher WK, Heer AH, Trabandt A, Bridges SL, Jr., Schroeder HW, Jr., Stransky G et al. Overexpression of zinc-finger transcription factor Z-225/Egr-1 in synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol* 1994; 152:5940-8.
- (130) Mohr W, Hummler N, Pelster B, Wessinghage D. Proliferation of pannus tissue cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1986; 6:127-32.
- (131) Nykanen P, Bergroth V, Raunio P, Nordstrom D, Konttinen YT. Phenotypic characterization of 3H-thymidine incorporating cells in rheumatoid arthritis synovial membrane. *Rheumatol Int* 1986; 6:269-71.
- (132) Chilov D, Hofer T, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Hypoxia affects expression of circadian genes PER1 and CLOCK in mouse brain. *FASEB J* 2001; 15:2613-22.

- (133) Bendova Z, Sumova S. Photoperiodic regulation of PER1 and PER2 protein expression in rat peripheral tissues. *Physiol Res* 2006; 55:623-32.
- (134) Ikeda M, Nomura M. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233:258-64.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
bHLH-Transkriptionsfaktor	basic Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor
BMAL1, <i>Bmal1</i>	Brain and muscle ARNt like protein 1
Bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCG	Clock controlled gene
CCP	cyclic citrullinated proteins, zyklisch cirtullinierte Proteine
Cdc2	Gen, das CDK1 kodiert
CDK1	cyclinabhängige Kinase 1
cDNA	complementary DNA, copy DNA, komplementäre DNA
CKI ϵ	Caseinkinase I ϵ
CLOCK, <i>Clock</i>	Circadian locomotor output cycles kaput
CRE	cAMP response element
CREB	Ca ²⁺ /cAMP-responsive element binding protein
CRY, <i>Cry</i>	Cryptochrom
Ct	cycle threshold
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethyldicarbonat
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest,
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	Fötales Kälberserum
HAT	Histon-Azetyltransferase
HLA	human leukocyte antigen
HRP	horse radish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1-Rezeptor

IL-6R	IL-6-Rezeptor
kDa	Kilodalton
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
NF κ B	nuclear factor κ of activated B-cells
ng	Nanogramm
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
OA	Osteoarthrose
OA-SF	synoviale Fibroblasten von Patienten mit Osteoarthrose
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PER, <i>Per</i>	Period
pg	Picogramm
PTM	posttranslational Modifikation
ptpn22	Gen, das LYP (eine Tyrosinkinase) kodiert
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RA	rheumatoide Arthritis
RA-SF	synoviale Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis
REV-ERB, NR1D1	nuclear receptor subfamily 1, group D
RGZ	retinale Ganglionzelle
RHT	retinohypothalamic tract; retinohypothalamische Bahn
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCN	suprachiasmatischer Nucleus
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R	TNF-Rezeptor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
x g	Erdbeschleunigung

7.2 Publikationsliste

7.2.1 Vorträge

Haas S., Falk W., Straub R.H.: Impact of IL-1 β and TNF on the circadian rhythm of synoviocytes in osteoarthritis and rheumatoid arthritis
7. Treffen des German-Endocrine-Brain-Immune Network (GEBIN), Frankfurt, Juli 2009

Haas S., Falk W., Straub R.H.: Impact of IL-1 β and TNF on the circadian rhythm of synoviocytes in osteoarthritis and rheumatoid arthritis
8. Treffen des German-Endocrine-Brain-Immune Network (GEBIN), Essen, April 2010

Haas S., Falk W., Straub R.H.: Impact of IL-1 β on the circadian rhythm of synoviocytes in osteoarthritis and rheumatoid arthritis
Meeting of the European League against Rheumatism (EULAR), Rom, Juni 2010

Haas S., Falk W., Straub R.H.: Zirkadianer Rhythmus der Synoviozyten bei rheumatoider Arthritis (RA)
38. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), Hamburg, September 2010

7.2.2 Posterpräsentationen

Haas S., Falk W., Straub R.H.: Zirkadiane Rhythmen bei rheumatoider Arthritis (RA)
36. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), Berlin, September 2008

Haas S., Falk W., Straub R.H.: Circadian Rhythms in Rheumatoid Arthritis (RA)
38. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGI), Wien, September 2008

Haas S., Falk W., Straub R.H.: Circadian rhythm of synoviocytes in rheumatoid arthritis (RA)

37. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), Köln, September 2009

Haas S., Falk W., Straub R.H.: Zirkadiane Rhythmik der Synoviozyten bei rheumatoider Arthritis

116. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V. (DGIM), Wiesbaden, April 2010

Haas S., Falk W., Straub R.H.: Impact of IL-1 β on the circadian rhythm of synoviocytes in osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA)

16th Annual Meeting of The Psychoneuroimmunology Research Society (PNIRS), Dublin, Juni 2010

7.2.3 Posterpreise

Haas S., Falk W., Straub R.H.: Circadian rhythm of synoviocytes in rheumatoid arthritis (RA)

37. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), Köln, September 2009

Haas S., Falk W., Straub R.H.: Zirkadiane Rhythmik der Synoviozyten bei rheumatoider Arthritis

116. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V. (DGIM), Wiesbaden, April 2010

7.3 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Rainer H. Straub für die Möglichkeit an diesem interessanten Projekt zu arbeiten, bedanken. Die perfekte Kombination aus Eigenständigkeit und umfassender Betreuung während dieser Zeit weiß ich sehr zu schätzen.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Charlotte Förster für die Übernahme des Erstgutachtens. Ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre wertvollen, fachlichen Beiträgen dazu hatten großen Anteil an ihrem Gelingen.

Des Weiteren möchte ich mich bei PD Dr. Peter Angele und Dr. Johannes Zellner aus der Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg für ihre Kooperativität und die Bereitstellung des Gewebes bedanken.

Vielen Dank Angelika für deine Unterstützung bei den ELISAs.

Danke auch an Dr. Klaus Stark, der immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und sich mit mir bereitwillig auf die Suche nach E-Boxen gemacht hat.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Prof. Dr. Werner Falk, der mir immer mit Rat zur Seite stand.

Herzlichen Dank an meine Arbeitskollegen, die alle auf ihre Art zu einem fantastischen Arbeitsklima beigetragen haben. Die vielen, wenn auch natürlich nicht immer fachlichen Gespräche, Diskussionen und vor allem auch die Unternehmungen außerhalb des Labors trugen maßgeblich dazu bei, dass das Ganze für mich weit mehr als eine einfache Arbeitsstelle war. Ganz besonderer Dank an Madlen, mit der ich einfach über ‚Gott‘ und die Welt reden kann und an Christoph, da ich immer auf ihn zählen konnte.

Danke auch an meine Eltern, die mich, trotz (meines!) fortgeschrittenen Alters, noch immer unterstützen. Hilfsleistungen in Form von Naturalien und Diesel waren keine Seltenheit. Sollte ich wider Erwarten doch noch mal Geld verdienen, zahl ich das (teilweise) zurück!

Auch vielen Dank an diejenigen, die in Regensburg die ‚elterliche‘ Fürsorge übernahmen. Danke Andrea und Emil, Angelika und Günter, Luise und Madlen, dass man immer auf euch zählen konnte!

Dann natürlich noch ‚Danke‘ an meine alte und neue Herausforderung Philipp, der meinen Ehrgeiz wieder geweckt hat und mich definitiv an meine Grenzen bringt.

Schließlich noch an alle ein Dankeschön, die ich nicht namentlich genannt habe, die aber zum Gelingen dieser Arbeit und/oder zur schönen Zeit in Regensburg auf ihre Art beigetragen haben.

DAAAAAAAANKE!