

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. M. MÜLLER-SCHILLING  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Auftreten und Lokalisation katecholaminerger Zellen bei  
experimentell induzierter Arthritis  
am Mausmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Humanmedizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Kristina Weber

2012



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. M. MÜLLER-SCHILLING  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Auftreten und Lokalisation katecholaminerger Zellen bei  
experimentell induzierter Arthritis  
am Mausmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Humanmedizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Kristina Weber

2012

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Rainer H. Straub

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Joachim Grifka

Tag der mündlichen Prüfung:

06.12.2012



# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>3</b>
2.1.	Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis .....	3
2.1.1.	Synoviale Veränderungen im Verlauf der rheumatoiden Arthritis .....	4
2.1.1.1.	Synoviale Hyperplasie .....	4
2.1.1.2.	Adhäsionsmoleküle.....	5
2.1.1.3.	Neoangiogenese .....	6
2.1.1.4.	Zelluläre Migration .....	7
2.1.2.	Neuroendokrino-immune Interaktionen .....	8
2.1.3.	Katecholaminstoffwechsel .....	10
2.2.	Ziel der Arbeit .....	13
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>14</b>
3.1.	Versuchstiere.....	14
3.2.	Zeitlicher Ablauf des Experiments.....	14
3.3.	Anatomie der Maus.....	16
3.4.	Beurteilung des Entzündungsgrades .....	18
3.4.1.	Ermittlung des klinischen Scores .....	18
3.5.	Immunfluoreszenz.....	20
3.5.1.	Darstellung der katecholaminergen Zellen mittels anti-VMAT-2 Färbung.....	20
3.5.2.	Doppelfärbung der Proben mit anti-VMAT-2- und anti-TH-Antikörpern .....	24
3.6.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	26
3.7.	Statistische Auswertung und Präsentation der Ergebnisse.....	26
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
4.1.	Synoviale Entzündung im Rahmen der Kollagen-Typ II-induzierten Arthritis .....	28
4.1.1.	Gelenkscore .....	28
4.1.2.	Histologie der Entzündung.....	30

4.2.	Dichte VMAT-2-positiver Zellen .....	32
4.2.1.	Lymphknoten .....	33
4.2.2.	Thymus.....	36
4.2.3.	Knochenmark .....	39
4.2.4.	Milz.....	42
4.3.	Speicherung von Katecholaminen in arthritischen Pfoten.....	45
4.4.	Ergebnisse der Doppelfärbungen .....	48
4.4.1.	Doppelfärbung VMAT-2 $\leftrightarrow$ VMAT-2 .....	48
4.4.2.	Doppelfärbung VMAT-2 $\leftrightarrow$ TH .....	51
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>57</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>59</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>65</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>67</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>68</b>
<b>11.</b>	<b>Erklärung an Eidesstaat .....</b>	<b>69</b>
<b>12.</b>	<b>Publikation .....</b>	<b>71</b>





## 1. Einleitung

In den 1950er Jahren wurde erneut die Annahme geäußert, dass das Immun- und das Nervensystem funktionell miteinander verbunden sind (1), nachdem derartige Zusammenhänge schon lange vermutet worden waren. Im Jahr 1987 zeigten Felten und Kollegen die enge Nähe zwischen Nervenfasern und Immunzellen in der Milz auf (2). Immunzellen exprimieren Rezeptoren für Neurotransmitter. Die funktionelle Bedeutung dieser Neurotransmitter wurde bereits vielfach aufgezeigt (3-7). Darüber hinaus bestätigt die klinische Erfahrung die starke Interaktion zwischen Nervenfasern und Immunreaktionen: Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) führt ein ischämischer Insult häufig zu einer unerklärbaren Remission der Arthritis in der paretischen Extremität. Im Jahr 2004 stellten Keyszer und Kollegen zwei Fälle vor, die nahelegten, dass vermutlich neurovaskuläre Mechanismen zu der Asymmetrie der Symptome beitragen (8).

Zwischen 1960 und den späten 1980er Jahren wurden eine Vielzahl von *in vivo* Studien durchgeführt, um die Rolle des sympathischen Nervensystems (SNS) zu untersuchen. Diese Studien beschrieben die pro-inflammatorische Rolle des SNS im Rahmen der frühen inflammatorischen Antwort (9). Ab den 1980er Jahren wurden durch die ansteigende Zahl von *in vitro* Langzeit-Experimenten sowie durch neue Techniken zur Darstellung von Zytokinen wichtige immuninhibitorische Effekte von sympathischen Neurotransmittern beschrieben (über  $\beta_2$ -adrenerge Pfade). Heutzutage ist bekannt, dass das SNS sowohl eine pro- als auch eine anti-inflammatorische Rolle einnehmen kann, abhängig von den beteiligten Rezeptoren sowie dem Zeitpunkt, an dem die sympathischen Neurotransmitter während des Entzündungsprozesses freigesetzt werden. Frühere Studien zeigten die pro-inflammatorische Rolle des SNS in der Frühphase der experimentell induzierten Arthritis und die anti-inflammatorische Rolle in der Spätphase (10). Letztere wird begleitet von einem Verlust der

sympathischen Nervenfasern; das ist der Grund, warum die anti-inflammatorischen Effekte des SNS bisher noch nicht erklärt werden können.

Bei vielen chronisch entzündlichen Krankheiten tritt eine deutliche Abnahme der Dichte der sympathischen Nervenfasern im entzündeten Gewebe auf (11-14). Die Abnahme der sympathischen Nervenfasern in entzündeten Gelenken wurde auch bereits im Modell der experimentell induzierten Arthritis aufgezeigt (10). Dennoch hatte, ungeachtet der Tatsache, dass die sympathischen Nervenfasern in entzündetem Gewebe verlorengehen, eine späte Sympathektomie einen starken pro-inflammatorischen Effekt auf die Arthritis. Man hatte das Gegenteil erwartet; die Ursachen für dieses Phänomen sind noch nicht bekannt. An dieser Stelle vermuteten wir, dass die Technik der chemischen Sympathektomie mit 6-Hydroxydopamin (6OHDA) andere wichtige Wirkungspfade, die für die beschriebenen Effekte verantwortlich sind, beeinflusst haben könnte. Tatsächlich können periphere Immunzellen während chronisch entzündlicher Erkrankungen wie RA (15, 16) und multipler Sklerose Katecholamine produzieren und aufnehmen, und es ist gut möglich, dass diese Zellen das Ziel von 6OHDA sind. Die Anwesenheit von Katecholamin-produzierenden Zellen im Synovialgewebe wurde bereits bei RA-Patienten in der Spätphase sowie im Mausmodell aufgezeigt (15). Es ist wesentlich, dass diese Zellen eine anti-inflammatorische Rolle zu spielen scheinen. Eine „single shot“ Freisetzung von Katecholaminen nach einer Reserpin-Behandlung dieser Synovialzellen löste eine Hemmung des Tumornekrosefaktors (TNF) und eine langandauernde Abnahme der Gelenkschwellung bei Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis (CIA) aus (15). Jedoch ist bisher nichts über den Zeitpunkt des Auftretens und den Ursprungsort dieser Katecholamin-produzierenden Zellen bei Arthritis bekannt.

## **2. Fragestellung**

### **2.1. Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis**

Charakteristisch für die rheumatoide Arthritis sind die chronische Entzündung in den Gelenken, die synoviale Hyperplasie sowie eine veränderte Immunreaktion. All diese Mechanismen führen im Verlauf der Erkrankung zur progressiven Destruktion der Gelenke (17). Wichtige Mediatoren des entzündlichen Prozesses sind hierbei Zytokine, die entsprechend ihrer Wirkungsweise hauptsächlich in pro- und anti-inflammatorisch wirksame Gruppen eingeteilt werden und für die Kommunikation zwischen Zellen verantwortlich sind. Dabei sind die Aufgaben der Zytokine vielfältig. Sie spielen eine Rolle in Wachstum, Differenzierung, Immunregulation und Chemotaxis der Zellen. Des Weiteren sind sie an der Vermittlung, aber auch an der Hemmung der Entzündung beteiligt. Im Krankheitsverlauf der RA sind T-Zellen, vor allem aber Fibroblasten und Makrophagen an der Sekretion der Zytokine beteiligt. Zentrale Zytokine im Zusammenhang mit der Entzündung bei der RA sind der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), und die Interleukine 1b und 6 (18, 19). In diesem Zusammenhang konnten Kollios und Kollegen bereits aufzeigen, dass Mäuse eine chronische Polyarthrititis entwickeln, wenn sie Träger des Gens für das humane TNF sind. Damit wurde ein neues Verfahren zur Entwicklung einer induzierten Arthritis im Mausmodell etabliert: hierbei wird eine Dysbalance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Faktoren stimuliert; dieses Ungleichgewicht wird für die RA des Menschen ebenfalls angenommen (20). Daher wurde und wird mit Hilfe verschiedener therapeutischer Strategien versucht, die Wirkung dieser Schlüsselzytokine durch spezifische neutralisierende Antikörper oder Rezeptor-Antagonisten im von der RA betroffenen Patienten zu unterdrücken. Hierzu gehören beispielsweise die TNF-Blockade, IL-1 Rezeptor-Antagonisten oder auch Antikörper gegen B-Zellen (21).

Neutralisierende Prinzipien gegen TNF wie Infliximab oder Etanercept werden bereits in der Behandlung beim Menschen eingesetzt.

### **2.1.1. Synoviale Veränderungen im Verlauf der rheumatoiden Arthritis**

Neben der chronischen Entzündung und Zellaktivierung ist die synoviale Hyperplasie das entscheidende Merkmal der RA. Folge dieser Prozesse ist die fortschreitende Destruktion des Gelenkknorpels und des Knochens.

#### **2.1.1.1. Synoviale Hyperplasie**

Durch die synoviale Hyperplasie, die man auch als Pannusbildung bezeichnet, kommt es zur Einwanderung des Synoviums in den darunter liegenden Knorpel und Knochen (22-24). Beim gesunden Patienten besteht die synoviale Deckzellschicht („lining layer“) aus ein bis zwei Zellschichten. Diese Schichten werden von Synoviozyten gebildet. Unter der synovialen Deckzellschicht befindet sich die Subintima („sublining“), diese Schicht enthält vor allem Blut- und Lymphgefäße, Fettzellen und neuronale Fasern (25+26). Frühe Veränderungen der Synovia bei RA sind nun die verringerte Apoptose der ortsständigen synovialen Zellen, die durch ihre längere Lebensdauer und eine damit verbundene Akkumulation zur Hyperplasie des *lining layers* und des *sublinings* beitragen. Des Weiteren kommt es zur Einwanderung von Entzündungszellen aus dem Blutkreislauf, darunter Leukozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen und natürlichen Killer-Zellen. Eine weitere frühe synoviale Veränderung bei RA ist die verstärkte Angiogenese (27, 28). Im Vergleich zur gesunden Deckzellschicht ist der *lining layer* bei RA-Patienten stark verdickt. Das hyperplastische Synovium überwächst zunächst den darunterliegenden Knorpel und wandert dann in ihn ein. Diese Invasion des Knorpels beginnt interessanterweise meist am Knorpel-Knochen-Übergang. Diese oft unaufhaltsame Zerstörung des Knorpels durch den Pannus ist ein für die RA spezifischer

Prozess und wurde vom Deutschen Krebsforschungszentrum „tumor-like proliferation“ genannt (29).

#### **2.1.1.2. Adhäsionsmoleküle**

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Pathophysiologie der RA ist die Adhäsion verschiedener Zelltypen des hyperplastischen Synoviums, vor allem von aktivierten synovialen Fibroblasten, an die Knorpelmatrix bzw. an synoviale Zellen. Adhäsionsmoleküle steuern dabei die multidirektionalen Interaktionen zwischen den einzelnen Komponenten Matrix, Entzündungszellen und Effektorzellen. Diese Interaktionen sind entscheidend für das Zusammenspiel der destruierenden Kräfte (30). Man unterscheidet vier verschiedene Gruppen von Adhäsionsmolekülen, die im Krankheitsverlauf der RA eine wichtige Rolle spielen: Selektine, Integrine, Immunglobuline und Cadherine (31-34). Selektine ermöglichen u. a. die Adhäsion der Leukozyten an das Endothel und damit den zentralen ersten Schritt der Infiltration von Entzündungszellen in das Gewebe. Integrine tragen zu Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen bei und sind in der Lage, intrazelluläre Signalwege zu induzieren. Immunglobuline sind durch die Bindung an Integrine ebenfalls an der Regulation biologischer Prozesse beteiligt. Cadherine spielen neben der Adhäsion eine Rolle in der Regulation intrazellulärer Signalwege, die z.B. zur Zellproliferation oder Produktion von Matrixmetalloproteinasen (MMP) führen (35). Adhäsionsmoleküle werden vor allem nach Induktion durch pro-inflammatorische Zytokine exprimiert. TNF spielt hier eine wichtige Rolle (36). Für aktivierte synoviale Fibroblasten am Pannus-Knorpel-Übergang konnte bereits eine erhöhte Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle nachgewiesen werden. Dazu gehören VCAM-1, ICAM-1, CD44 und verschiedene Integrine (37-41). Weiterhin spielen Adhäsionsmoleküle eine zentrale Rolle bei der zellulären Adhäsion an Endothelzellen und der Transmigration von Entzündungszellen in das Synovialgewebe.

### 2.1.1.3. Neoangiogenese

Die Neoangiogenese ist bei der Wundheilung oder Tumor-Progression sowie bei der RA ein wichtiges Merkmal. Es handelt sich hierbei um einen komplexen Prozess, bei dem die zur Bildung der Gefäßwände notwendigen Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen durch verschiedene angiogenetische Wachstumsfaktoren wie den Fibroblast Growth Factor (FGF) und den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) aktiviert werden. Hierbei wird das die Kapillare umgebende Bindegewebe lysiert und es erfolgt die Zellmigration kleiner Zellausläufer in das Gewebe. Neue Kapillaren entstehen durch Proliferation und Migration von vorbestehenden Endothelzellen. Die spätere Umwandlung der Kapillaren in Arteriolen und Arterien und Venolen und Venen stellt den Abschluss des durch Wachstumsfaktoren getriggerten Prozesses der Angiogenese dar und wird durch die Aktivierung bestimmter Gene festgelegt. Während Mitglieder der Notch-Familie für die Arteriogenese zuständig sind, wird die Bildung der Venen durch den Transkriptionsfaktor COUP-TFII gesteuert. Die abschließende Wandausbildung wird in beiden Fällen durch FGF, Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Angiopoietin-1 reguliert (42). Die Gefäßneubildung wird im RA-Synovium durch die Dysbalance zwischen angiogenetischen Faktoren und deren Inhibitoren schon zu Beginn der Erkrankung induziert und resultiert in der Aktivierung des Endothels (43-45). Die Transmigration der Leukozyten aus dem Gefäßsystem in das synoviale Gewebe wird ermöglicht; hierdurch kommt es zu einer veränderten, fortdauernden Neoangiogenese (46, 47). Durch die im Rahmen der RA vorherrschende Hypoxie im Gelenk kommt es zusätzlich zur Expression proinflammatorischer Zytokine, darunter IL-1 $\beta$  und TNF, sowie proangiogenetischer Faktoren, vor allem VEGF, M-CSF (macrophage colony stimulating factor), TGF  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) und bFGF (basic fibroblast growth factor), es werden aber auch Matrix-degradierende Enzyme exprimiert (48, 49). Durch Aktivierung der Endothelzellen tragen all diese Faktoren zur Durchlässigkeit der Gefäße bei. Es kommt daraufhin durch Matrixabbau zur Abwanderung, Proliferation und Migration endothelialer

Zellen. Die nachfolgenden Interaktionen von Angiopoietin 1 mit dem Tyrosinkinase Rezeptor 2 führen zur Stabilisierung der neu entstandenen Gefäße. Eine weitere Folge ist die gesteigerte Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten, wodurch der Einstrom weiterer Entzündungszellen ermöglicht wird, die zusätzliche proangiogenetische Faktoren sezernieren. Brooks und Mitarbeiter konnten bereits 1994 durch Integrin-Antagonisten bzw. -Antikörper die Angiogenese im Tiermodell hemmen (50).

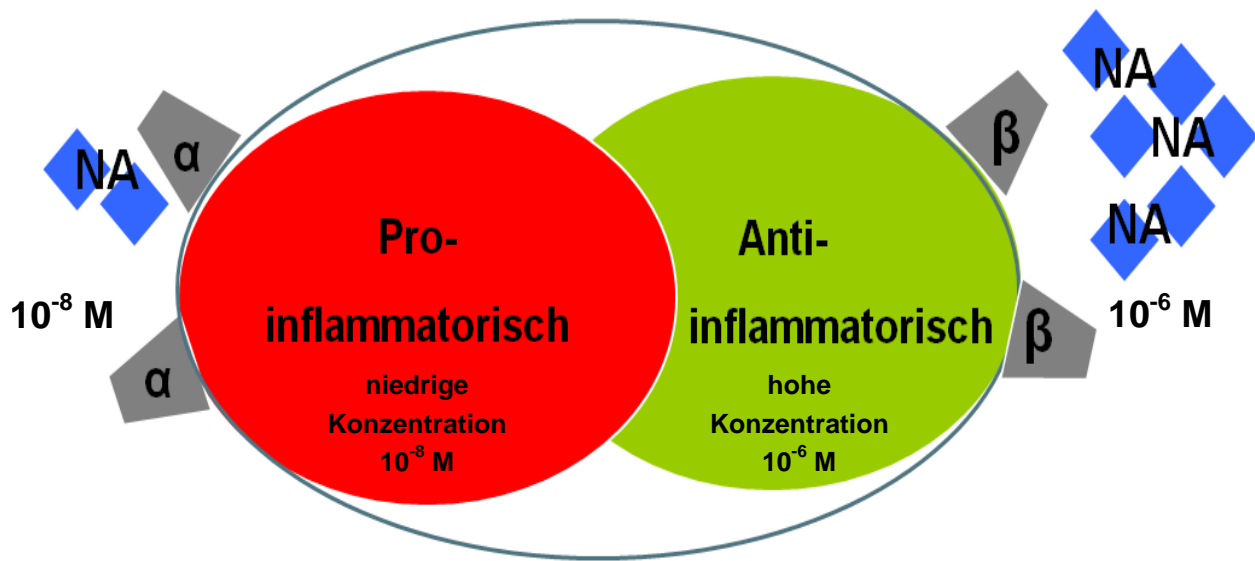
#### **2.1.1.4. Zelluläre Migration**

Die Zellmigration spielt bei vielen physiologischen Prozessen eine Rolle. Dazu gehört die Rekrutierung von Immunzellen zum Ort der Immunantwort. Während der adaptiven und zellulären Immunantwort werden zirkulierende Leukozyten zum Verlassen des Blutstroms angeregt, um zu lymphatischen Organen oder zu infiziertem bzw. entzündetem Gewebe zu gelangen. Dabei kommt es nach Bindung zum Selektin-vermittelten *rolling* der Leukozyten entlang der durch Entzündung oder Infektion aktivierten Endothelzellen. Die Sekretion verschiedener Chemokine durch geschädigte Zellen und Entzündungszellen an der betroffenen Stelle führt zur Aktivierung der Endothelzellen, die in einer erhöhten Expression von Integrinen, VCAM-1 und ICAM-1 resultiert. Über Adhäsionsmoleküle kommt es zur starken Bindung der Leukozyten an Endothelzellen und nachfolgend zur Transmigration durch die Gefäßwände (51, 52). Die Migration von Neutrophilen und Monozyten bzw. Makrophagen führt zur Sekretion von Chemokinen und Wachstumsfaktoren (53). Folgen sind die Aktivierung und Rekrutierung von gewebsständigen Fibroblasten durch Chemokine zum betroffenen Ort sowie eine erhöhte Angiogenese. Fibroblasten spielen in der ersten entzündlichen Phase der Wundheilung eine essentielle Rolle. Sie migrieren lokal durch das Gewebe zur geschädigten Stelle, adhären an die extrazelluläre Matrix (EZM), bauen das geschädigte Gewebe ab und sezernieren Matrixproteine zum Aufbau einer gesunden Matrix (54).

### **2.1.2. Neuroendokrino-immune Interaktionen**

In den letzten Jahren wurde eine Interaktion zwischen dem Immunsystem, dem autonomen Nervensystem und dem endokrinen System in zahlreichen Studien untersucht. Es wurde dabei gezeigt, dass durch die Neurotransmitter Adrenalin, Noradrenalin (NA) und Dopamin unter anderem das Immunsystem moduliert werden kann. Beispielsweise inhibieren diese neuronalen Botenstoffe wichtige inflammatorische Mechanismen wie die Produktion von TNF durch Monozyten und Makrophagen oder die Aktivierung von natürlichen Killerzellen. Die Wirkungen des sympathischen Nervensystems auf das Immunsystem sind dabei von unterschiedlichen Einflussfaktoren abhängig und sehr komplex (Abb. 1). Beispielsweise ist die Wirkung von Katecholaminen abhängig vom Adrenorezeptor (AR)-Typ. Adrenerge Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Sie lassen sich grob in drei Gruppen ( $\alpha$ 1-Rezeptoren,  $\alpha$ 2-Rezeptoren und  $\beta$ -Rezeptoren) einteilen, wobei Noradrenalin eine deutlich (ca. 100-fach) höhere Affinität zu  $\alpha$ -AR als zu  $\beta$ -AR hat. In niedrigen Konzentrationen stimuliert Noradrenalin vorwiegend  $\alpha$ -AR, in hohen Konzentrationen wirkt es vor allem über  $\beta$ -AR. Dabei wirkt die Stimulation von  $\beta$ -AR eher entzündungshemmend, während die Stimulation von  $\alpha$ 1-AR und  $\alpha$ 2-AR proinflammatorische Effekte auslöst (55-57).





*Abb. 1: Veranschaulichung der Wirkung von Katecholaminen in Abhängigkeit vom Adrenozeptor (AR)-Typ. Die Stimulation von  $\beta$ -AR wirkt entzündungshemmend, Noradrenalin wirkt vor allem in hohen Konzentrationen über diesen Rezeptor (grün). Die Stimulation von  $\alpha$ 1-AR und  $\alpha$ 2-AR löst proinflammatorische Effekte aus, in niedrigen Konzentrationen stimuliert Noradrenalin vorwiegend diese Rezeptoren (rot).*

Daher würde man erwarten, dass zum Beispiel im entzündeten Synovialgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis die Dichte an Nervenfasern des sympathischen Nervensystems zunehmen würde, da dies einen inhibitorischen Einfluss auf die Entzündungssituation haben sollte. Im Gegensatz zu diesen Erwartungen zeigte sich in den Studien von Miller und Kollegen aber, dass im Synovialgewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis ein zunehmender Verlust von sympathischen Nervenfasern zu beobachten war. Dafür zeigten sich die pro-inflammatorisch wirkenden sensiblen Nervenfasern im Vergleich von RA- zu Osteoarthrose (OA)-Patienten erhöht (16). Für die Detektion der sympathischen Nervenfasern wurde das Schlüsselenzym der Katecholaminproduktion, die Tyrosinhydroxylase, verwendet. Überraschenderweise ist jedoch die Freisetzung von NA im Gewebe von RA-Patienten nicht vermindert, was zu der Annahme führt, dass die Katecholamine noch in anderer Form vorhanden sein müssen. Zu dieser Hypothese passt, dass die Abnahme der Nervenfasern mit einer Zunahme von neuronalen Zellen in verschiedenen Geweben einhergeht (10). Diese neuronalen Zellen sind zumeist Tyrosinhydroxylase-positiv.

### **2.1.3. Katecholaminstoffwechsel**

Die Tyrosinhydroxylase (TH) ist dasjenige Enzym, das die Umwandlung der Aminosäure L-Tyrosin in die Aminosäure Levodopa katalysiert; diese Umwandlung ist der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt bei der Biosynthese der Katecholamine. TH wird beim Menschen in Nebennieren und Gehirn produziert. Die Hemmung der TH erfolgt durch Andocken von Dopamin an zwei Stellen am Enzym (Abb. 2). Durch Phosphorylierung eines Serin-Rests an einer der Andockstellen kann TH wieder aktiviert werden. Die phosphorylierte Form ist daher gut geeignet zum Nachweis der Zellen in Mäuse-Organen.

Der vesikuläre Monoamintransporter-2 (VMAT-2) ist ein integrales Membranprotein, das Monoamine – insbesondere Neurotransmitter wie Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin – aus

dem Zytosol in synaptische Vesikel transportiert (ATP- und protonenabhängiger Transportmechanismus) (58). VMAT-2 spielt somit eine Schlüsselrolle bei der Freisetzung von Katecholaminen und ist daher geeignet zur Detektion neuronaler Zellen (Abb. 2).

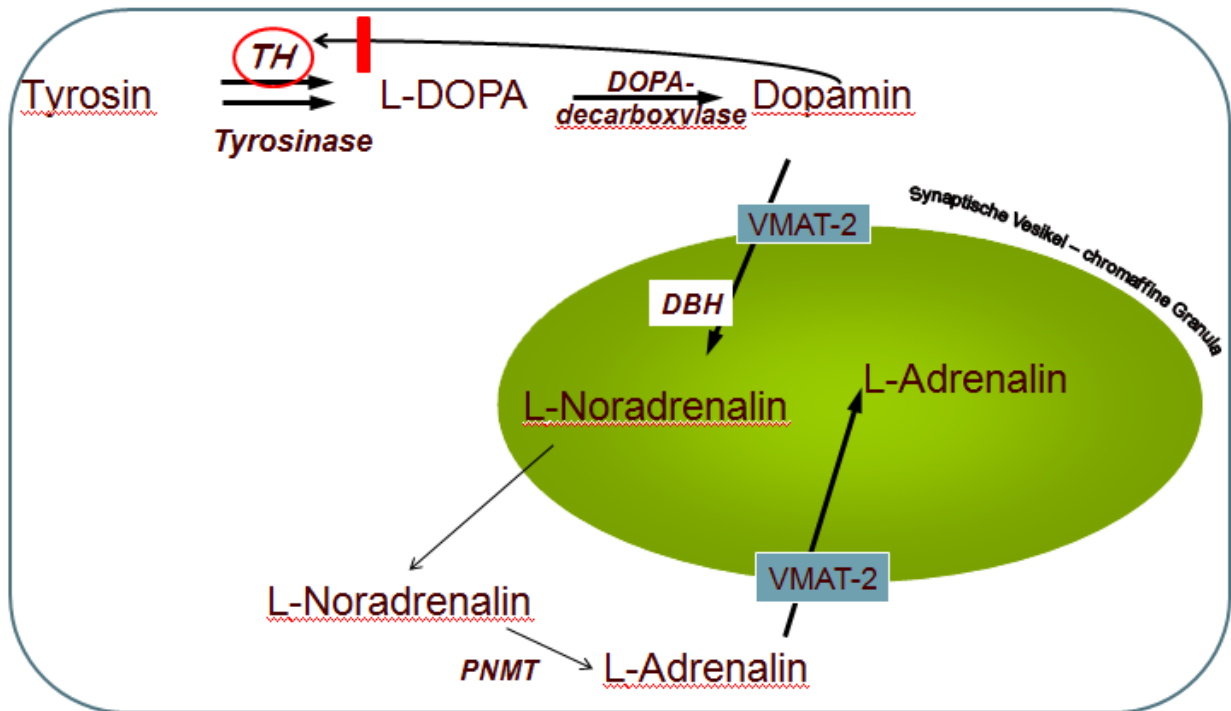


Abb. 2: Darstellung der Rolle der Tyrosinhydroxylase (TH) sowie des vesikulären Monoamintransporters-2 (VMAT-2) im Katecholaminstoffwechsel. Die TH ist dasjenige Enzym, das die Umwandlung der Aminosäure L-Tyrosin in die Aminosäure Levodopa katalysiert; diese Umwandlung ist der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt bei der Biosynthese der Katecholamine. Die Hemmung der TH erfolgt durch Andocken von Dopamin an zwei Stellen am Enzym. Durch Phosphorylierung eines Serin-Rests an einer der Andockstellen kann TH wieder aktiviert werden. Der vesikuläre Monoamintransporter-2 (VMAT-2) ist ein integrales Membranprotein, das Monoamine – insbesondere Neurotransmitter wie Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin – aus dem Zytosol in synaptische Vesikel transportiert (ATP- und protonenabhängiger Transportmechanismus). DBH: Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase, PNMT: Phenylethanolamin-N-Methyltransferase.

## **2.2. Ziel der Arbeit**

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, das Auftreten und die Lokalisation der Katecholamin-produzierenden und –speichernden Zellen in verschiedenen Organen sowie in den Gelenken von Mäusen nach der Induktion von Kollagen Typ II – induzierter Arthritis zu untersuchen. Es wurde die Zelldichte in den Organen an verschiedenen Zeitpunkten bei Arthritis-Mäusen im Vergleich mit einer Kontrollgruppe untersucht. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf den Zeitpunkt des Auftretens der katecholaminergen Zellen sowie auf Unterschiede im Verlauf bei den einzelnen untersuchten Organen gelegt.

Des Weiteren sollte mittels eines Scoresystems eine klinische Einschätzung des Fortschreitens der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis gemäß dem klinischen Symptomverlauf erfolgen. Im Anschluss konnten dann Vergleiche zur Kontrollgruppe gezogen werden.

Im letzten Teil der Arbeit sollte nun die Frage beantwortet werden, ob katecholamin-produzierende und –speichernde Zellen einander entsprechen oder nicht, hierfür wurde das Prinzip der Doppelfärbungen angewandt. Es wurden an identischen Präparaten Färbungen durchgeführt, um so eine Vergleichbarkeit der Methodik zu ermöglichen.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Versuchstiere**

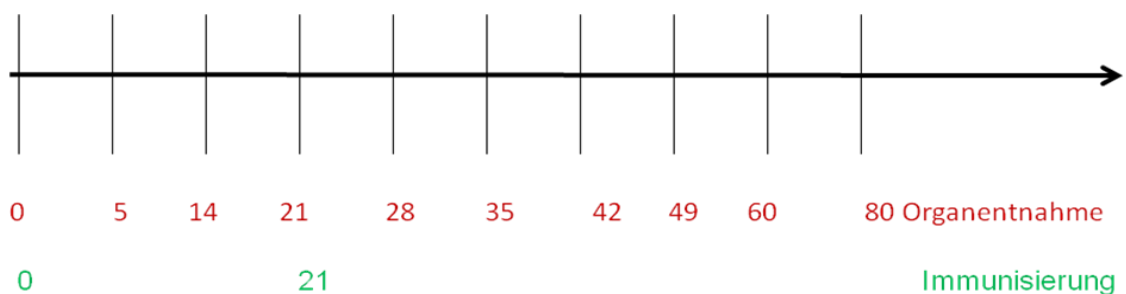
Es wurden 40 männliche DBA/1J-Mäuse, 6-8 Wochen alt, der Firma Janvier (Janvier, Le Genest-St-Isle, Frankreich) für die Experimente verwendet. Die Tiere erhielten nach Ankunft eine mindestens einwöchige Eingewöhnungszeit. Sie wurden in 6er Gruppen pro Käfig unter Standardbedingungen gehalten und mit handelsüblichem Laborfutter und Wasser ad libitum versorgt. Die Tiere unterlagen einem 12-stündlichem Helligkeits-/Dunkelheits-Zyklus. Alle Experimente unterlagen den entsprechenden Tierschutzbestimmungen und wurden behördlich genehmigt (hier: Regierung der Oberpfalz AZ 54-2531.1-07/08).

#### **3.2. Zeitlicher Ablauf des Experiments**

Die Experimente am Tiermodell erstreckten sich über 80 Tage. Die Tiere wurden zunächst in zwei Gruppen zu je 20 Mäusen eingeteilt. Die Kontrollgruppe erhielt Placebo-Injektionen mit Natriumchlorid, während bei den Tieren der Versuchsgruppe eine Kollagen-Typ-II-Arthritis induziert wurde. Dazu erhielten die Mäuse am Tag 0 eine intradermale Injektion von 100 µg bovinem Kollagen-Typ-II (Chondrex, Redmond, WA) in die Schwanzwurzel; das Kollagen wurde dafür in einer entsprechenden Menge von Freund's komplettem Adjuvant (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gelöst. Am Tag 21 nach der ersten Injektion erfolgte eine Auffrischung mit wiederum 100 µg bovinem Kollagen-Typ-II, gelöst in einer entsprechenden Menge von Freund's inkomplettem Adjuvant; auch diese Injektion erfolgte in die Schwanzwurzel.

Zur immunhistologischen Aufarbeitung erfolgte an festgesetzten Zeitpunkten die Organentnahme. Es wurden die Gelenke der oberen und unteren Extremität, Milz, drainierende Lymphknoten, Kolon, Knochenmark, Thymus und Nebennieren entnommen.

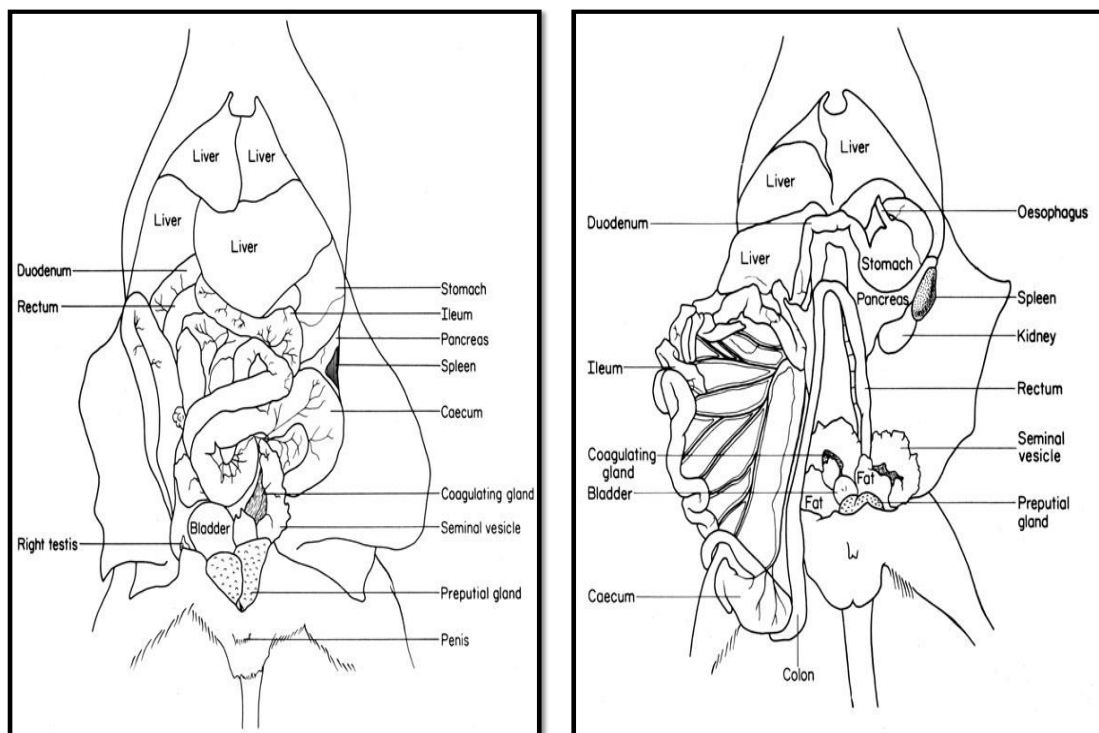
Unmittelbar nach Gewinnung der Präparate wurden die Extremitäten in einer Lösung bestehend aus 4% Formalin und 96% Phosphatpuffer (phosphate buffered saline, PBS) für 3-5 Tage inkubiert, danach in PBS gewaschen. Zur Entkalkung der Knochen wurde eine RDO-Lösung (Rapid decalcifier, Apex Engineering Products Corp., Aurora, IL) verwendet. Die Präparate blieben bis zur Aufweichung der Kalkanteile in der Lösung, was etwa 4 Tage in Anspruch nahm. Anschließend wurden die Pfoten nochmals in PBS gewaschen, um dann über Nacht in 20% Saccharose (Merck, Darmstadt) zu verbleiben. Die Saccharose wurde in DEPC-H<sub>2</sub>O-PBS gelöst. Die übrigen Organe mussten nicht entkalkt werden. Sie wurden nur in Formalin und anschließend in Saccharose eingelegt. Um die Gewebe mit Immunfluoreszenz untersuchen zu können, wurden sie in einem protektiven Gefriermedium (Tissue Tek®; Satura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die folgende Abbildung (Abb. 3) veranschaulicht den Ablauf.



**Abb. 3: Zeitlicher Ablauf des Experiments**

### 3.3. Anatomie der Maus

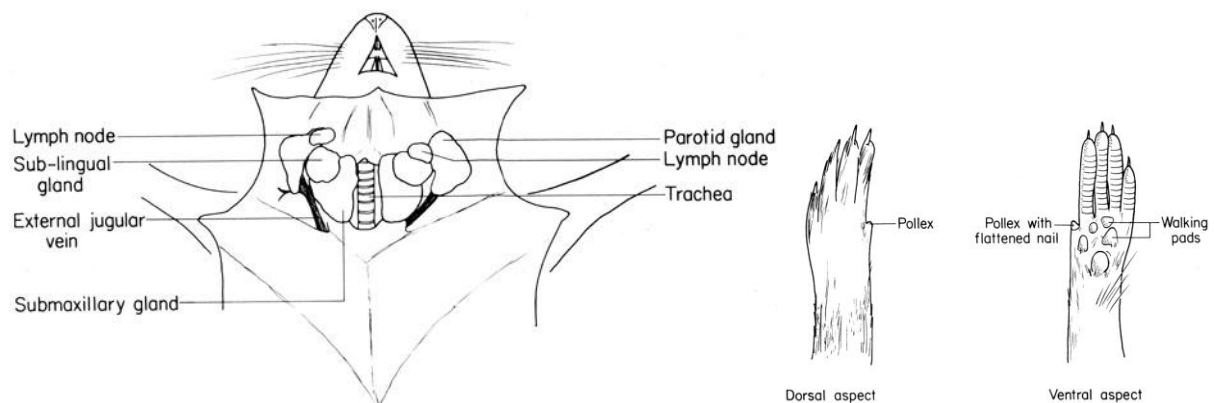
Die im Folgenden gezeigten Bilder (Abb. 4) veranschaulichen die Anatomie der für den experimentellen Teil verwendeten Labormaus. Im rechten Bild ist unterhalb des Magens die intraperitoneal gelegene Milz zu erkennen, in welcher als sekundär lymphatisches Organ auch bei Mäusen im Rahmen der Immunabwehr die antigeninduzierte Differenzierung und Vermehrung von B- und T-Lymphozyten stattfindet.



**Abb. 4: Gastrointestinaltrakt der Maus (59)**



Die zweite Abbildung (Abb. 5) zeigt die um die Trachea gelegenen Lymphknoten der Maus. Mit dem Fortschreiten der Kollagen-induzierten Arthritis bei den immunisierten Tieren lässt sich eine reaktive Lymphadenopathie beobachten. An den Pfoten ist die Erkrankung zuerst meist im Bereich der Fußwurzelknochen, der Metacarpophalangealgelenke und der proximalen Interphalangealgelenke makroskopisch zu beobachten.

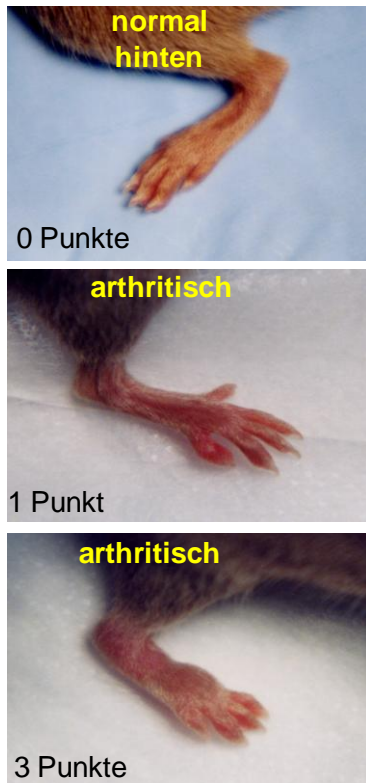


**Abb. 5: Lymphknoten (links) und Pfoten (rechts) der Maus (59)**

### **3.4. Beurteilung des Entzündungsgrades**

#### **3.4.1. Ermittlung des klinischen Scores**

Bei den Labormäusen wurde vor der Tötung jede Pfote nach klinischen Arthritiszeichen beurteilt. Wurde eine sichtbare Gelenkschwellung, die Beteiligung eines Zehengelenks, Mittelfußgelenks oder Sprunggelenks festgestellt, wurde jeweils ein Punkt vergeben. Wurde die Pfote beim Auftreten geschont bzw. überhaupt nicht mehr benutzt erhielt die Extremität einen zusätzlichen Punkt. Pro Pfote konnten so maximal vier Punkte, für das gesamte Tier maximal 16 Punkte vergeben werden (Abb. 6).



### **Klinische Arthritis-Bewertung– Gelenk-Score:**

Bewertung des Arthritisgrades nach  
**Gelenkregionen** für jede Extremität

**1 Punkt** = Schwellung ± Rötung  
einer Gelenkregion

**2 Punkte** = Schwellung ± Rötung  
zweier Gelenkregionen

**3 Punkte** = Schwellung ± Rötung  
dreier Gelenkregionen

**4 Punkte** = zusätzliches Hinken

Maximal sind 16 Punkte pro Tier  
möglich.

*Abb. 6: Klinischer Gelenk-Score: Bei den Labormäusen wurde vor der Tötung jede Pfote nach klinischen Arthritiszeichen beurteilt. Wurde eine sichtbare Gelenkschwellung, die Beteiligung eines Zehengelenks, Mittelfußgelenks oder Sprunggelenks festgestellt, wurde jeweils ein Punkt vergeben. Wurde die Pfote beim Auftreten geschont bzw. überhaupt nicht mehr benutzt erhielt die Extremität einen zusätzlichen Punkt. Pro Pfote konnten so maximal vier Punkte, für das gesamte Tier maximal 16 Punkte vergeben werden (Bilder: Alexander Faßold).*

### **3.5. Immunfluoreszenz**

Der Hauptteil der Studie bestand aus der immunhistochemischen Färbung der Mäuseorgane mit einem anti-VMAT-2 Antikörper zur Darstellung katecholaminspeichernder Zellen. Im letzten Teil der experimentellen Arbeit wurde dann eine Doppelfärbung der Proben mit einem anti-TH Antikörper durchgeführt, um auch die katecholaminproduzierenden Zellen detektieren zu können.

#### **3.5.1. Darstellung der katecholaminergen Zellen mittels anti-VMAT-2 Färbung**

Zur Färbung wurden von den in Tissue Teck® eingefrorenen Geweben 5 µm dicke Schnitte mit dem Kryotom angefertigt und auf einen Objektträger (Super Frost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) übertragen. Pro Objektträger wurden drei Schnitte aufgebracht. Für jeden untersuchten Zeitpunkt gab es Proben von je zwei Mäusen der Arthritis- und der Kontrollgruppe. Zur internen Kontrolle des Färbeerfolges wurde außerdem pro Zeitpunkt eine Negativkontrolle erstellt.

Nach dem Schneiden mussten die Schnitte bei Raumtemperatur eine Stunde trocknen. Dann wurden die Präparate für 10 Minuten in PBS rehydriert. Anschließend konnten die Schnitte mit einem Fettstift (Silikon) umrandet und in Dunkelkammern (mit Millipore-Wasser befeuchtet) gelegt werden. Die Umrandung mit dem Fettstift verhinderte das spätere Auslaufen der Blocklösung und der Antikörperverdünnungen.

Im ersten Schritt wurden nun ca. 30-200 µl (je nach Größe) einer dreifachen Blocklösung auf jeden Schnitt pipettiert, anschließend ließ man die Proben bei geschlossenem Deckel 45 Minuten inkubieren. Die Blockung unspezifischer Bindungen erfolgte mit 10% Hühnerserum, 10% fötalem Kälberserum und 10% bovinem Albumin in PBS + Triton 0,3%. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte für fünf Minuten in einfachem PBS gewaschen.

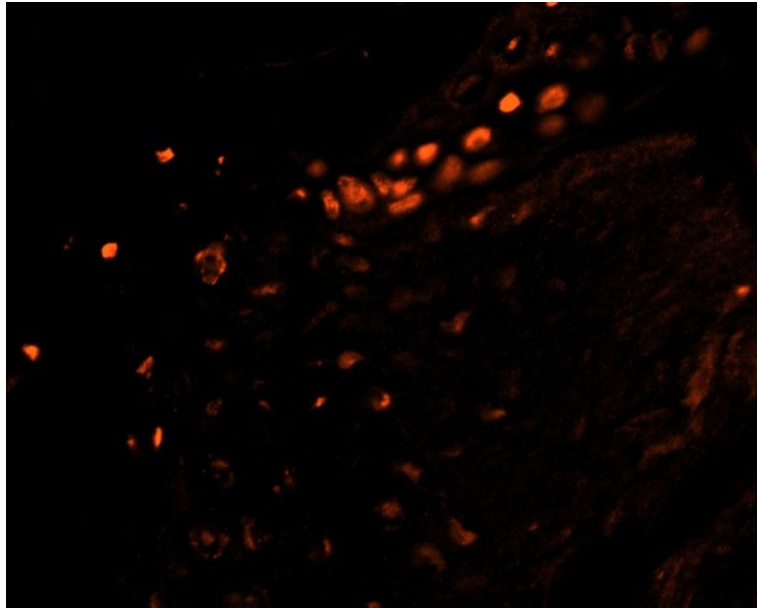
Nun folgte die Applikation der Primär-Antikörper-Lösung. Hierfür wurde der anti-VMAT-2 Antikörper (rabbit anti-VMAT-2, #sc-15314, H-90, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland) 1:40 in 10% Ziegenserum (9 ml PBS + Triton + 1 ml 100% Ziegenserum) verdünnt (Tab. 1). Nun wurden 30-200 µl Primär-Antikörper auf jeden Schnitt pipettiert; auf die Negativ-Kontrollen wurde jedoch nur 10% Ziegenserum gegeben. Dann wurden die Objektträger abgedeckt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte dann nochmals dreimaliges Waschen für je fünf Minuten, die ersten beiden Male in PBS + Triton 0,3%, beim letzten Mal nur in einfachem PBS. Die Negativkontrollen wurden im Weiteren stets getrennt gewaschen.

Ab jetzt musste in Dunkelheit gearbeitet werden, da der sekundäre Antikörper (goat anti-rabbit Alexa Fluor 546 #A-11010, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) fluoreszierte (Tab. 1). Die Verdünnung des sekundären Antikörpers erfolgte im Verhältnis 1:500 in 10% Ziegenserum; appliziert wurden mit sterilen Spitzen wiederum 30-200 µl auf jeden Schnitt, diesmal auch auf die Negativkontrollen, da die spezifische Bindung des sekundären Antikörpers an den primären kontrolliert werden sollte. Die Inkubation erfolgte für 90 Minuten bei Raumtemperatur.

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte wiederum dreimaliges Waschen für je fünf Minuten, die ersten beiden Male in PBS + Triton 0,3%, beim letzten Mal in einfachem PBS.

Im letzten Schritt wurden die Schnitte noch für 3 Minuten in PBS mit 0,01% 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Roche Diagnoszics, Mannheim, Deutschland) inkubiert. Dadurch konnten die Zellkerne sichtbar gemacht werden. Zuletzt wurde zur gleichen Zeit bei allen Objektträgern der Puffer abgegossen und Schnitte bei Dunkelheit eingedeckelt (Eindeckelmedium: Fluorescent Mounting Medium, DAKO, Hamburg, Deutschland). Die Schnitte wurden bei Dunkelheit im Kühlschrank gelagert, wobei die Fluoreszenz ca. eine Woche gut haltbar war (Abb. 7).



*Abb. 7: Immunfluoreszenzbild eines Mausgelenks zur Darstellung der VMAT-2 positiven (VMAT-2<sup>+</sup>) Zellen in 400-facher Vergrößerung.*

**Tab. 1: Verwendete Antikörper, Verdünnungslösungen und Verdünnungskonzentrationen**

		<b>Verdünnungs- lösung</b>	<b>Verdünnungs- konzentration</b>
<b>Primärantikörper</b>	<b>anti-VMAT-2</b> #sc-15314, H-90, rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland	PBS mit 0,3% Triton und 10% goat serum	1:40
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Alexa Fluor 546</b> goat anti-rabbit, #A-11010, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	PBS mit 0,3% Triton und 10% goat serum	1:500

### **3.5.2. Doppelfärbung der Proben mit anti-VMAT-2- und anti-TH-Antikörpern**

Die Doppelfärbung der Mäuseorgane mit einem anti-VMAT-2- und einem anti-TH-Antikörper erfolgte aufgrund der Fragestellung bezüglich einer Übereinstimmung von katecholaminspeichernden (VMAT-2+) und katecholaminproduzierenden (TH+) Zellen. Die Färbungen wurden gemäß dem oben dargelegten Färbeprotokoll durchgeführt. Zunächst wurden Doppelfärbungen mit zwei anti-VMAT-2 Antikörpern durchgeführt, wobei der erste Antikörper dem oben verwendeten entsprach, der zweite Antikörper jedoch ein goat anti-VMAT-2 Antikörper (goat anti-VMAT-2, #sc-7722, N-19, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland) war. Mit Hilfe dieser Methode konnten die positiven Zellen des ersten Antikörpers in roter, die des zweiten Antikörpers in grüner Fluoreszenz dargestellt werden. Es erfolgte eine zweifache Applikation der Primär-Antikörper-Lösungen. Nach Durchführung der Waschungen erfolgte die zweifache Applikation der Sekundär-Antikörper-Lösungen. Hierfür wurden der oben genannte Sekundärantikörper sowie ein zweiter Antikörper (rabbit anti-goat Alexa Fluor 568 #A-11079, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Im zweiten Schritt wurde nun eine Doppelfärbung mit einem anti-TH Antikörper (rabbit anti-TH, #2129, Epitomics, via Biomol, Hamburg, Germany) sowie dem neuen anti-VMAT-2 Antikörper (goat anti-VMAT-2, #sc-7722, N-19, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Der TH-Antikörper wurde 1:500 in 10% Ziegenserum (9 ml PBS + Triton + 1 ml 100% Ziegenserum) verdünnt. Nun wurden 30-200 µl Primär-Antikörper-Lösungen auf jeden Schnitt pipettiert; auf die Negativ-Kontrollen wurde auch hier nur 10% Ziegenserum gegeben. Auch hier war im nächsten Schritt eine zweifache Applikation der Sekundär-Antikörper-Lösungen erforderlich. Bei dieser Färbung zeigten sich nun die VMAT-2+ Zellen in grüner, die TH+ Zellen in roter Fluoreszenz (Tab. 2).



**Tab. 2: Verwendete Antikörper, Verdünnungslösungen und Verdünnungskonzentrationen der Doppelfärbungen**

		<b>Verdünnungs- lösung</b>	<b>Verdünnungs- konzentration</b>
<b>Doppelfärbung</b> <b>VMAT-2 ↔ VMAT-2</b>  <b>Doppelfärbung</b> <b>VMAT-2 ↔ TH</b>	<b>anti-VMAT-2</b> #sc-15314, H-90, rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland	PBS mit 0,3% Triton und 10% goat serum	1:40
	<b>anti-VMAT-2</b> #sc-7722, N-19, goat polyclonal Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland	PBS mit 0,3% Triton und 10% goat serum	1:100
	<b>anti-TH</b> #2129 rabbit polyclonal, Epitomics, via Biomol, Hamburg, Germany	PBS mit 0,3% Triton und 10% goat serum	1:500
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Alexa Fluor 546</b> goat anti-rabbit, #A-11010, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	PBS mit 0,3% Triton und 10% goat serum	1:500
	<b>Alexa Fluor 568</b> rabbit anti-goat, #A-11079, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	PBS mit 0,3% Triton und 10% goat serum	1:500

### **3.6. Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Zur besseren Übersicht über die anatomischen Verhältnisse wurden von jedem Organ einige Schnitte in Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Um seine färbende Eigenschaft zu entwickeln, musste das Hämatoxylin zu Hämalaun (basischer Hämateinlack) aufbereitet werden. Hämalaun färbt alle basophilen Strukturen blau, insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA und das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum. Eosin färbt alle eosinophilen Strukturen rot, was vor allem die Zellplasmae Proteine umfasst.

Zur Färbung wurden die Kryoschnitte ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend 3 Minuten in Hämalaunlösung gegeben. Das überschüssige Hämalaun wurde anschließend mit Wasser abgewaschen. Dann wurden die Objektträger für 90 Sekunden in Eosin mit etwas Essigsäure inkubiert. Nun wurden die Schnitte in eine Äthanolreihe mit ansteigender Konzentration gegeben, um das Wasser aus dem Gewebe zu verdrängen: Zunächst wurden die Präparate kurz in 50%, dann kurz in 70%, für 30 Sekunden in 96% und schließlich für eine Minute in 100% Alkohol getaucht.

Zur Fixierung wurden die Objektträger noch 2 Minuten in Xylol gelegt, dann konnten sie mit Roti®-Histokit II (Mayer's Hämatoxylin und Eosin, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) eingedeckelt werden.

### **3.7. Statistische Auswertung und Präsentation der Ergebnisse**

Die mikroskopische Betrachtung mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leitz DMRBE, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) erfolgte bei 400facher Vergrößerung. Zur Ermittlung der durchschnittlichen Dichte an neuronalen VMAT-2 positiven (VMAT-2<sup>+</sup>) Zellen wurden jeweils 17 repräsentative Auswertfelder (Größe 450 µm x 600 µm) pro Organ, Zeitpunkt und Tier untersucht. Durch Multiplikation mit einem entsprechenden

Umrechnungsfaktor wurde die durchschnittliche Zahl von Zellen pro mm<sup>2</sup> ermittelt. Bei der Untersuchung der Schnitte der Mäusepfoten mussten diese Gesichtsfelder jeweils ein Gelenk und das umgebende synoviale Gewebe enthalten. Außerdem wurde die positive Immunfluoreszenz durch Kontrollschnitte im gleichen Gewebe kontrolliert. Die Kontrollschnitte wiesen außer der normalen Eigenfluoreszenz des Gewebes keine weiteren fluoreszierenden Strukturen auf und waren damit stets negativ.

Die Datenerfassung erfolgte als Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung. Zur Auswertung wurde das Programm Sigma Plot (Sigmaplot V11, Systat Software, Erkrath, Deutschland) verwendet. Mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test erfolgte der Vergleich der Gruppen untereinander. Die Ermittlung des p-Wertes wurde mit der Software Sigma Stat (Sigma Stat ® 3.5) durchgeführt. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als signifikant eingestuft.

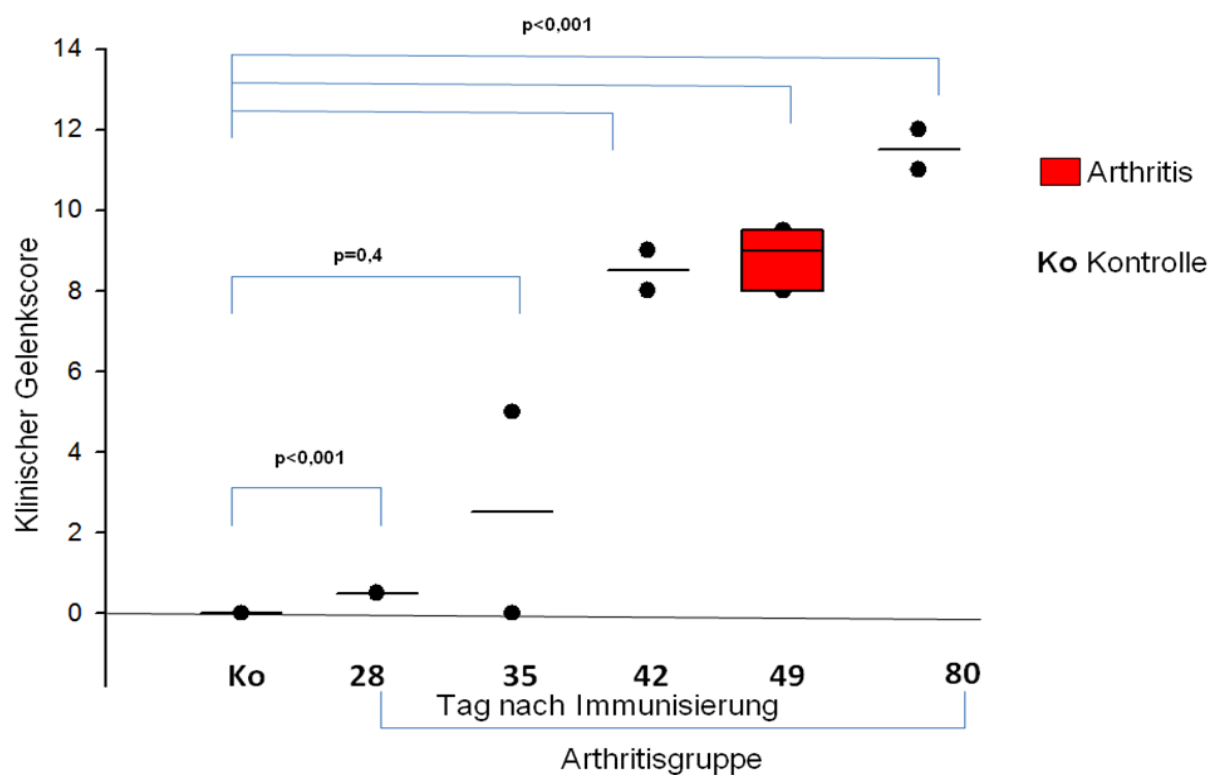
Die graphische Darstellung der Versuchsergebnisse erfolgte mittels Boxplots, diese repräsentieren die 25., 50. (Median) und 75. Perzentile. Zur Darstellung der einzeln erfassten Werte wurden Scatter plots darüber gelegt. Die Zelldichte wurde jeweils zu den angegebenen Zeitpunkten nach Immunisierung bestimmt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Synoviale Entzündung im Rahmen der Kollagen-Typ II-induzierten Arthritis**

#### **4.1.1. Gelenkscore**

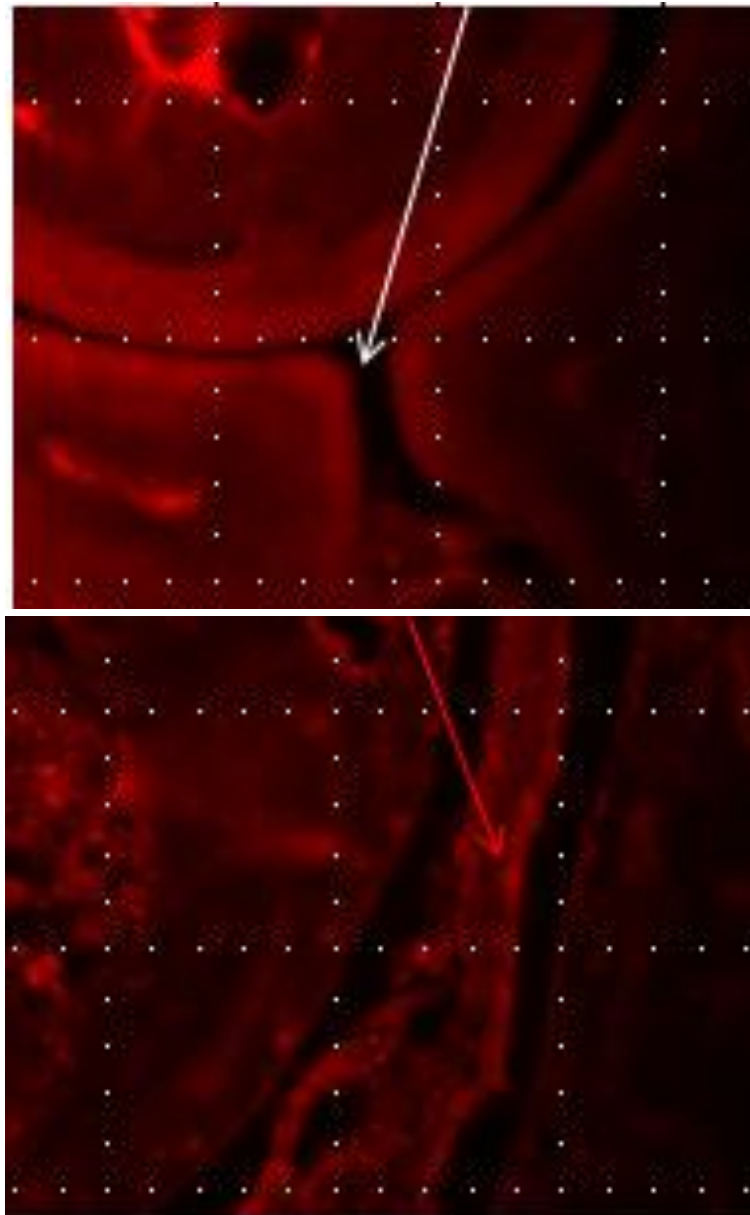
Es wurde das oben beschriebene Scoresystem zur klinischen Einschätzung des Fortschreitens der Kollagen II-induzierten Arthritis gemäß dem klinischen Symptomverlauf angewandt. Bereits ab Tag 28 konnte ein hochsignifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 8). Der Schweregrad der klinischen Manifestation nahm mit zunehmendem Abstand vom Zeitpunkt der Arthritisinduktion zu. Erste ausgeprägte Gelenkschwellungen konnten an Tag 35 beobachtet werden.



**Abb. 8: Klinischer Gelenkscore bei immunisierten CIA-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren (Ko)**

#### **4.1.2. Histologie der Entzündung**

In den Gelenken der gesunden Tiere der Kontrollgruppe zeigt sich histologisch ein nicht verschmälerter Gelenkspalt. Die Struktur von Knorpel und Knochen ist intakt, das Synovialgewebe ist nicht verdickt (Abb. 9). Nach wenigen Tagen zeigen sich erste arthritische Veränderungen bei den Tieren der Arthritis-Gruppe im Sinne eines zellkernreichen Pannusgewebes (verdicktes Synovialgewebe). Der Pannus infiltriert Knochen und Knorpel (Abb. 9). Im weiteren zeitlichen Verlauf wird der Knorpel fortlaufend zerstört, der Gelenkspalt ist vollständig mit Pannusgewebe und infiltrierenden Zellen ausgefüllt.



**Abb. 9:** Repräsentative VMAT-2 Färbungen von Mäusepfoten: oben gesundes Gelenk einer Kontroll- Maus, unten arthritische Veränderungen im Sinne eines mit Pannus und infiltrierenden Zellen ausgefüllten Gelenkspaltes einer Arthritis-Maus an Tag 42 nach Immunisierung (weißer Pfeil: freier Gelenkspalt, roter Pfeil: mit Pannus ausgefüllter Gelenkspalt).

## **4.2. Dichte VMAT-2-positiver Zellen**

VMAT-2+ Zellen konnten in allen analysierten Organen nachgewiesen werden. Der Zeitpunkt der höchsten Dichte an VMAT-2+ Zellen variierte zwischen den einzelnen untersuchten Organen. Generell stieg die Dichte an VMAT-2+ Zellen auch in allen Organen der Kontroll-Mäuse an, was auf einen altersabhängigen Anstieg dieser bestimmten Zellen deutet. In den folgenden Kapiteln wird die Dichte gezeigt.



#### **4.2.1. Lymphknoten**

In den untersuchten Lymphknoten war die Dichte der VMAT-2+ Zellen bei den Arthritis-Mäusen signifikant höher im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Abb. 10). Dieser Unterschied zeigte sich bereits während der frühen, asymptomatischen Phase der Arthritis (Abb. 10). Am höchsten war die Dichte der VMAT-2+ Zellen in den Lymphknoten der Mäuse mit Kollagen-induzierter Arthritis an Tag 35 nach Immunisierung, ein deutlicher Anstieg der Zelldichte zeigte sich ab Tag 28.

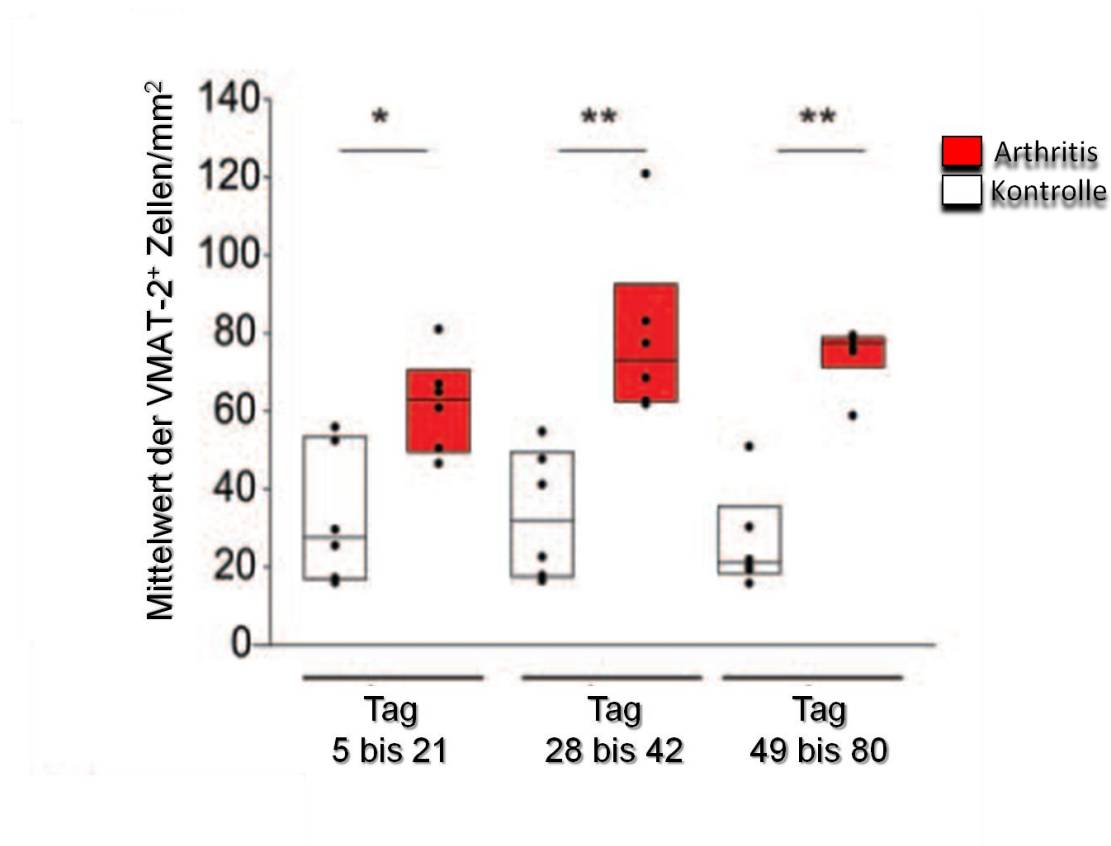
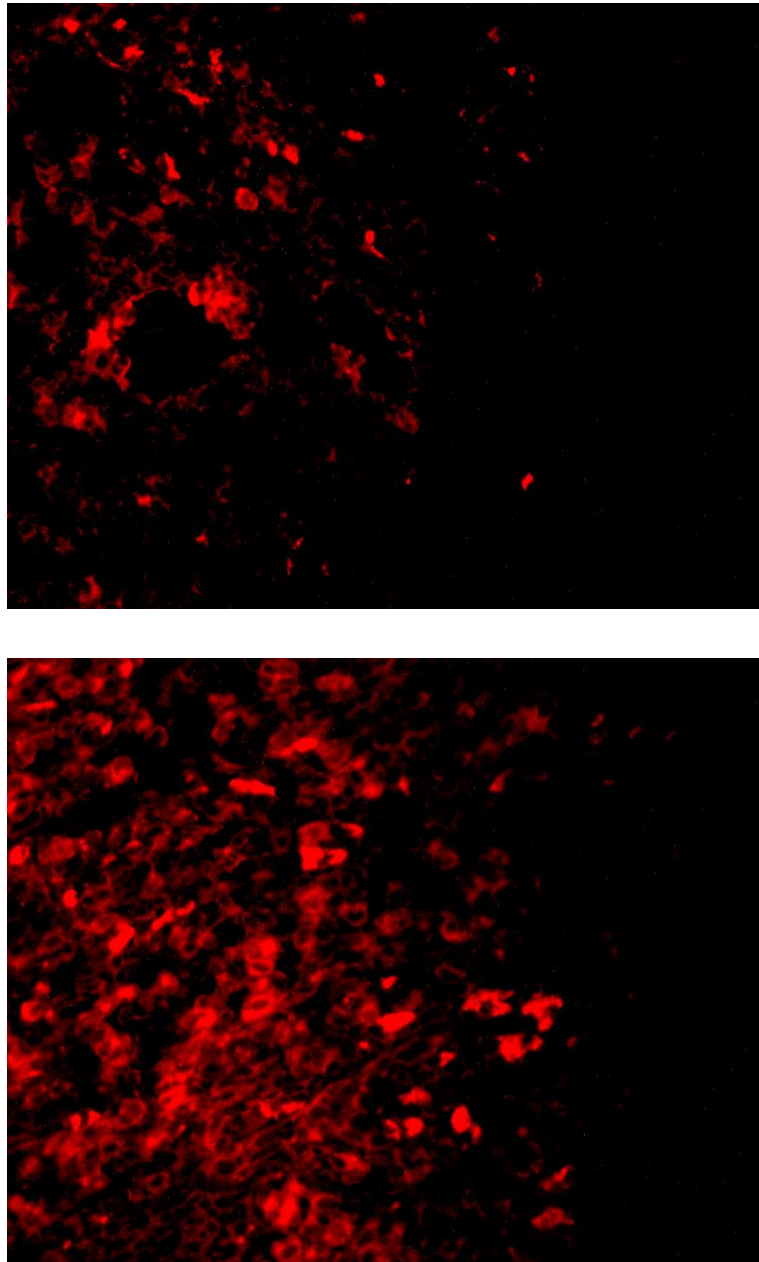


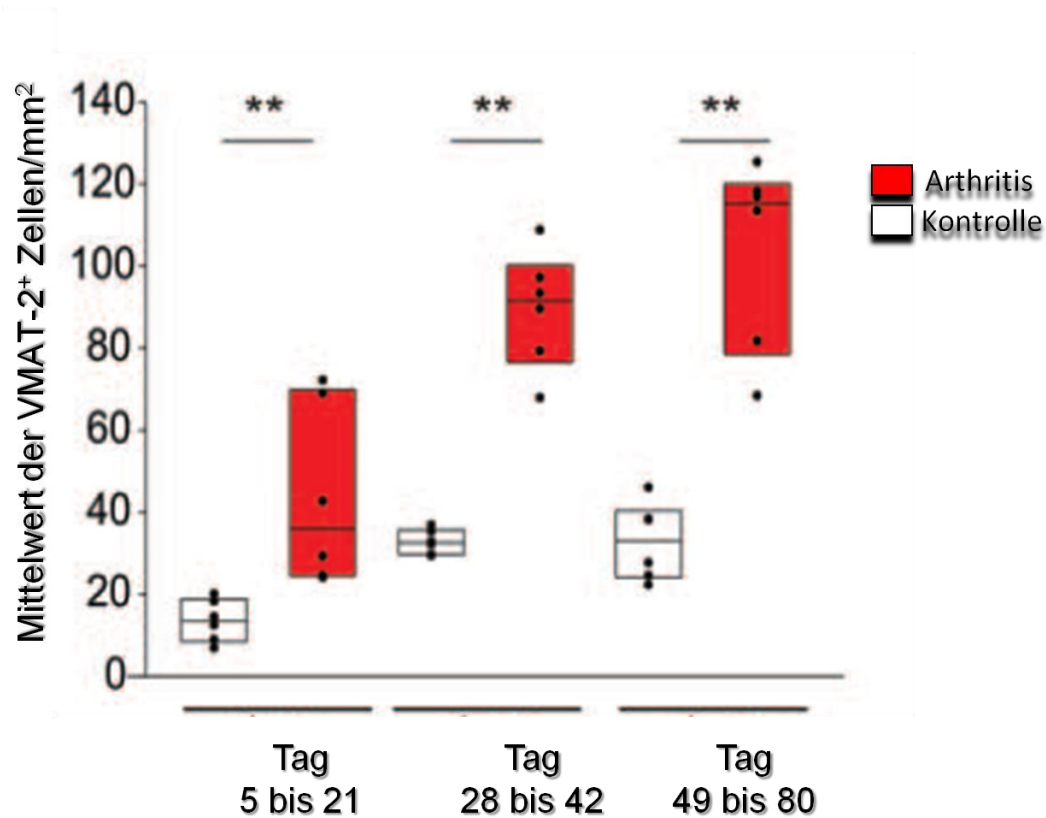
Abb. 10: Dichte der VMAT-2+ neuronalen Zellen in Lymphknoten bei Mäusen mit induzierter Arthritis (rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiß). Die Zelldichte wurde jeweils zu den angegebenen Zeitpunkten nach Immunisierung bestimmt. Die Daten sind mittels Boxplots dargestellt, diese repräsentieren die 25., 50. (Median) und 75. Perzentile. Die Scatterplots (runde Punkte) stellen die einzeln erfassten Werte dar (n=6 Mäuse pro Gruppe). \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.005$ .



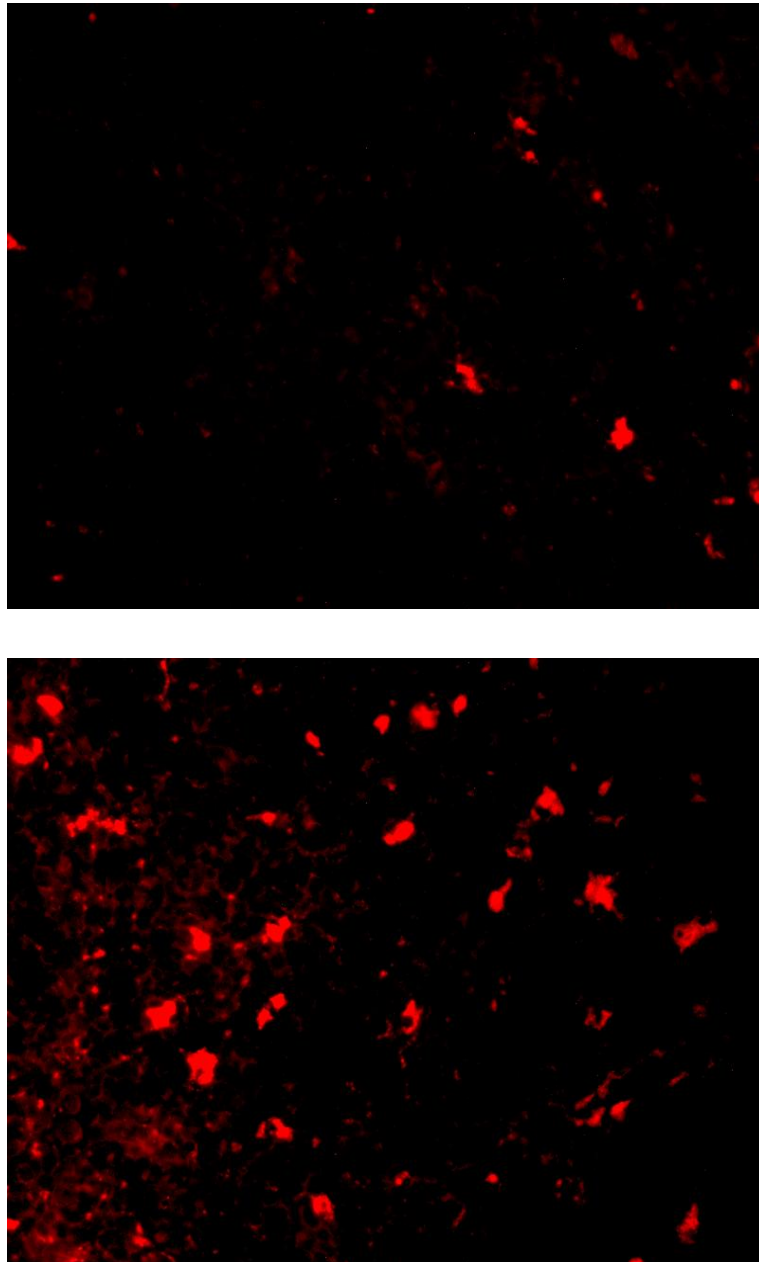
**Abb. 11: VMAT-2+ Zellen in Lymphknoten an Tag 42 nach Kollagen-Immunisierung (oben: Kontroll-Maus, unten: Arthritis-Maus)**

#### **4.2.2. Thymus**

Im Thymus, dem zweiten untersuchten primär lymphatischen Organ, verhielt es sich ähnlich wie im Lymphknoten, hier war die Dichte der VMAT-2+ Zellen ebenfalls signifikant höher bei den Arthritis-Mäusen; eine erste Differenz konnte auch hier bereits in den ersten Tagen nach Immunisierung beobachtet werden (Abb. 12). Die Dichte der VMAT-2+ Zellen nahm in der Kontrollgruppe nur geringfügig zu, während sie bei den Mäusen mit induzierter Arthritis stark anstieg. Die höchste Dichte an VMAT-2+ Zellen wurde während der Spätphase erreicht, zwischen Tag 49 und 60 nach Immunisierung (Abb. 12, 13).



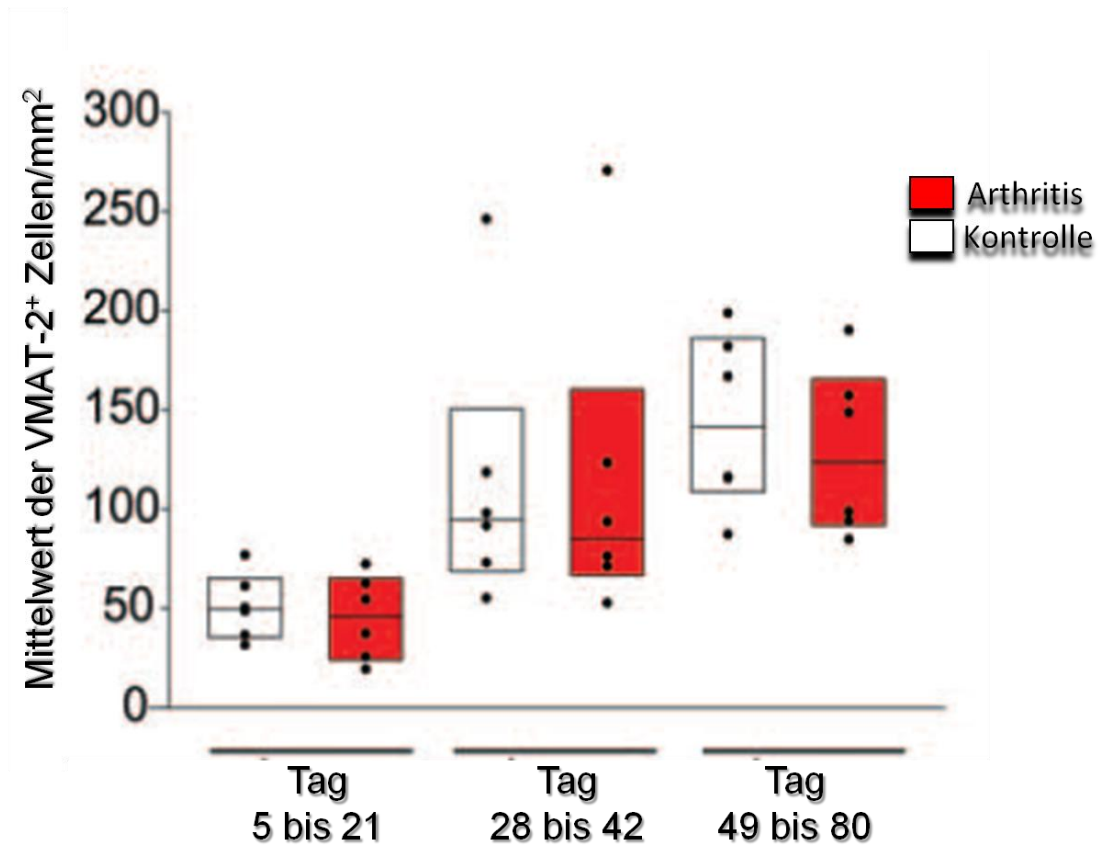
**Abb. 12:** Dichte der VMAT-2+ neuronalen Zellen im Thymus bei Mäusen mit induzierter Arthritis (rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiß). Die Daten sind mittels Boxplots dargestellt, diese repräsentieren die 25., 50. (Median) und 75. Perzentile. Die Scatterplots (runde Punkte) stellen die einzeln erfassten Werte dar (n=6 Mäuse pro Gruppe). \*\* =  $p < 0.005$ .



***Abb. 13: VMAT-2+ Zellen im Thymus an Tag 60 nach Kollagen-Immunisierung (oben: Kontroll-Maus, unten: Arthritis-Maus)***

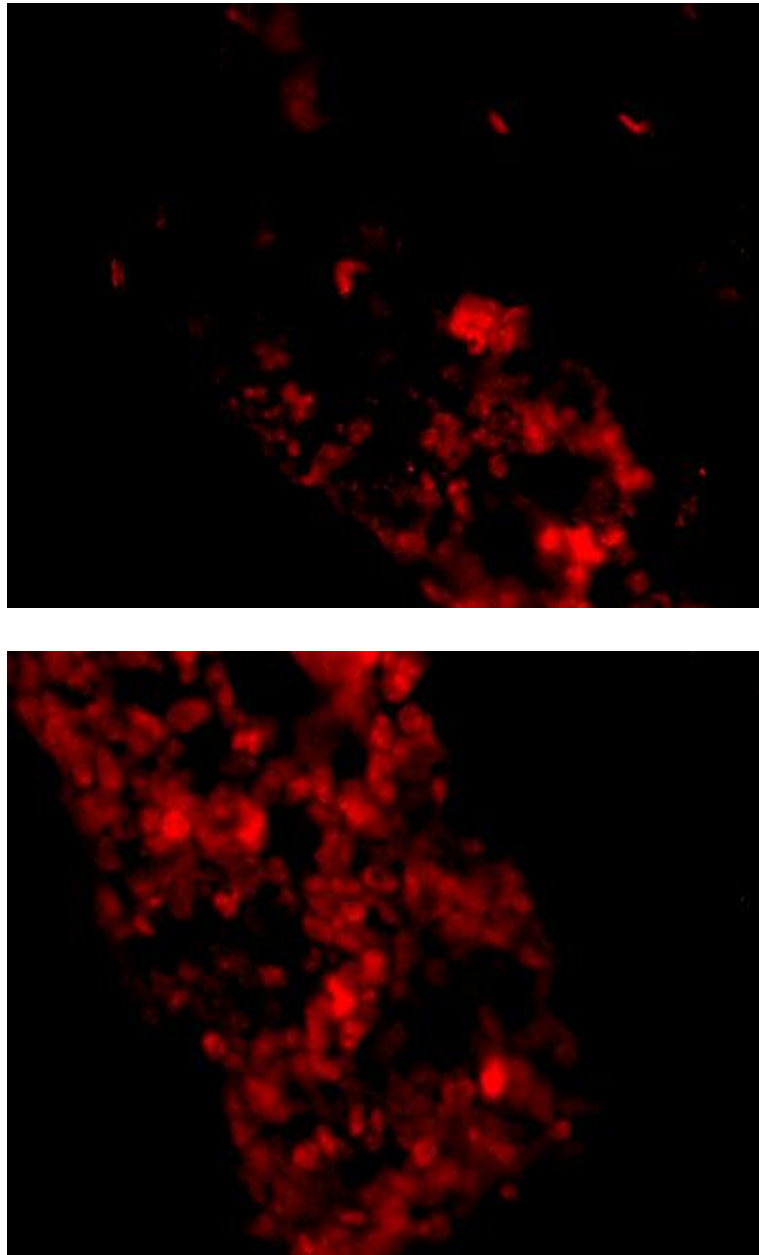
#### **4.2.3. Knochenmark**

Das Knochenmark der Tiere wurde jeweils aus dem rechten und linken Oberschenkel entnommen. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Arthritis- und Kontrollgruppe beobachtet werden; zwar stieg die Dichte der VMAT-2+ Zellen bei den Mäusen mit induzierter Arthritis im Krankheitsverlauf an, jedoch konnte ein ähnlicher Anstieg auch bei den gesunden Kontrolltieren gefunden werden (Abb. 14, 15).



**Abb. 14:** Dichte der VMAT-2+ neuronalen Zellen im Knochenmark bei Mäusen mit induzierter Arthritis (rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiß). Die Daten sind mittels Boxplots dargestellt, diese repräsentieren die 25., 50. (Median) und 75. Perzentile. Die Scatterplots (runde Punkte) stellen die einzeln erfassten Werte dar (n=6 Mäuse pro Gruppe).

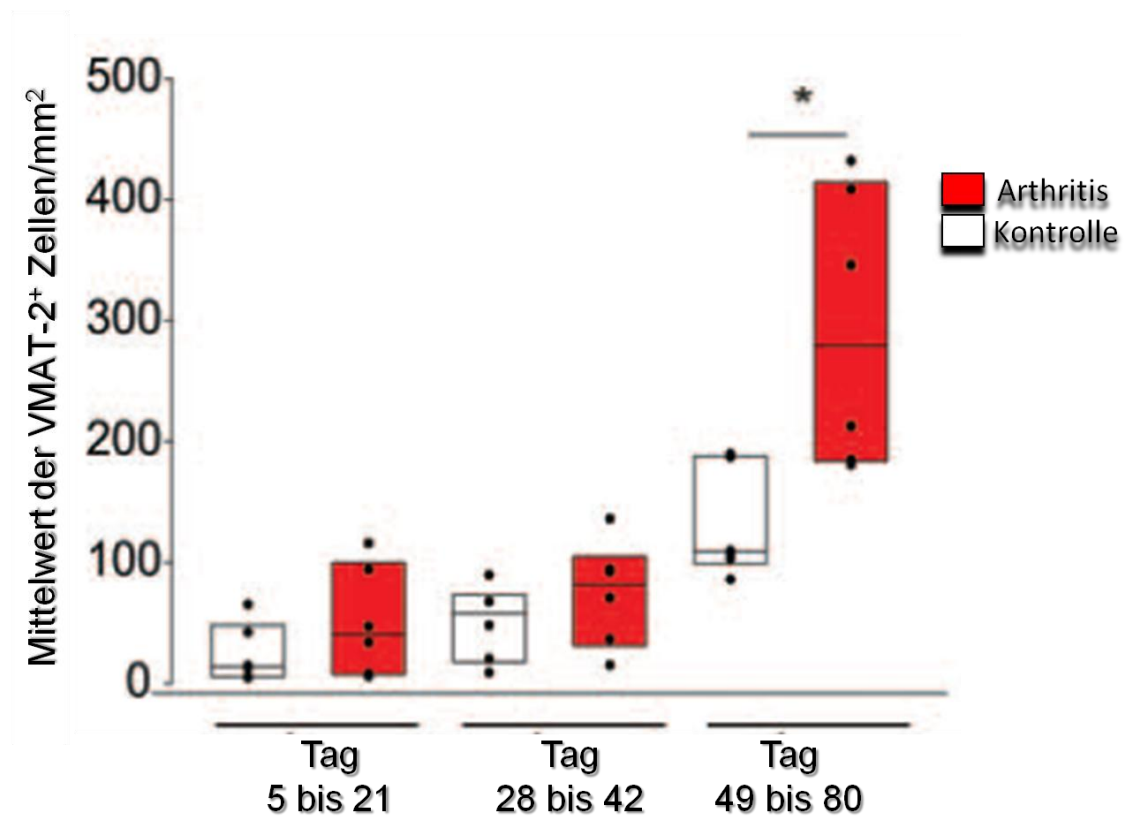




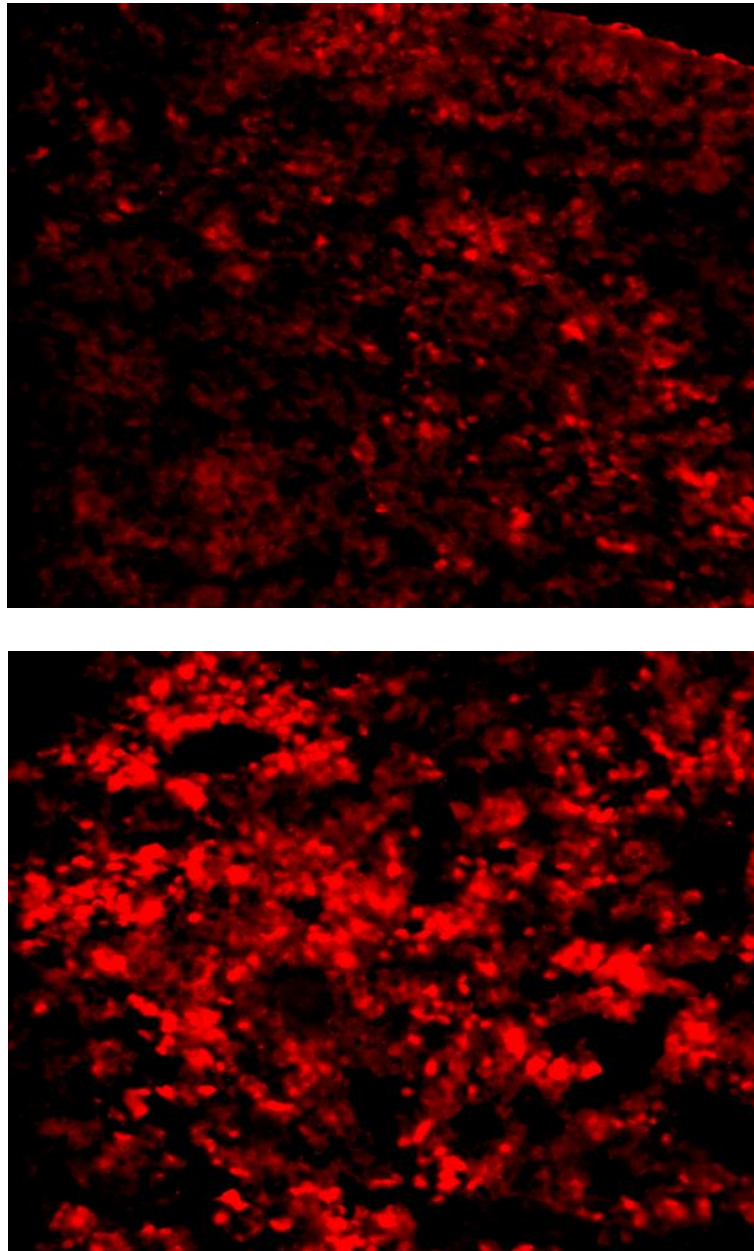
**Abb. 15: VMAT-2+ Zellen im Knochenmark rechts an Tag 42 nach Kollagen-Immunisierung  
(oben: Kontroll-Maus, unten: Arthritis-Maus)**

#### **4.2.4. Milz**

In der Milz zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Arthritis- und Kontrollgruppe erst während der Spätphase der Arthritis, also ab Tag 49 bis 80. Auch hier stieg die Zelldichte bei den Tieren der Kontrollgruppe an, die Gesamtzellzahl war jedoch signifikant niedriger als bei den Tieren der Arthritisgruppe (Abb. 16, 17).



**Abb. 16:** Dichte der VMAT-2+ neuronalen Zellen in der Milz bei Mäusen mit induzierter Arthritis (rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiß). Die Daten sind mittels Boxplots dargestellt, diese repräsentieren die 25., 50. (Median) und 75. Perzentile. Die Scatterplots (runde Punkte) stellen die einzeln erfassten Werte dar (n=6 Mäuse pro Gruppe). \* =  $p < 0.05$ .

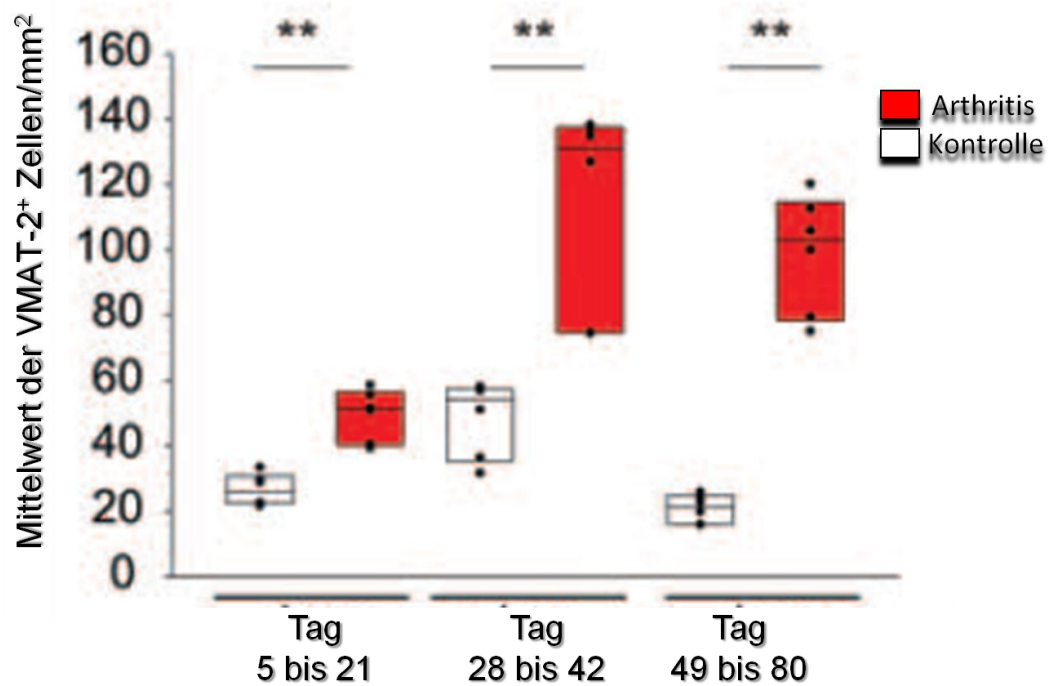


**Abb. 17: VMAT-2+ Zellen in der Milz an Tag 42 nach Kollagen-Immunisierung**

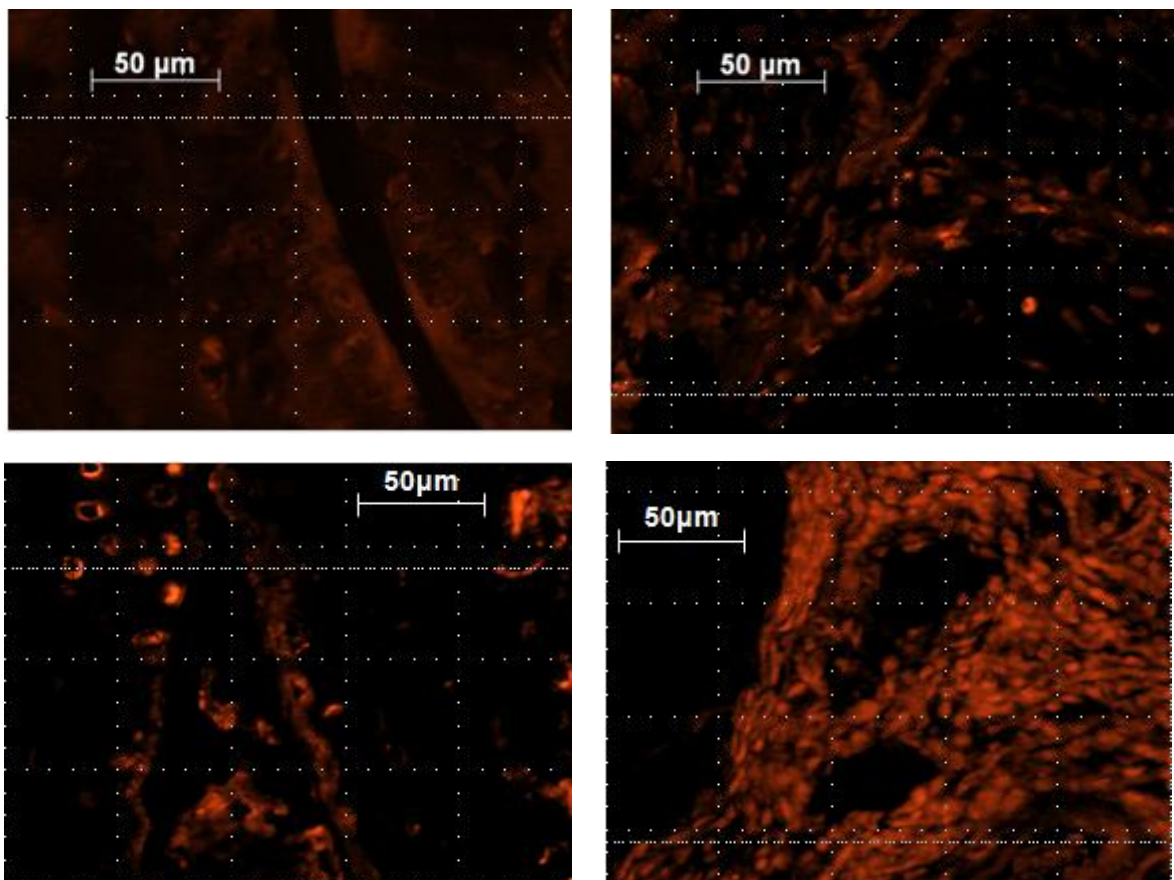
**(oben: Kontroll-Maus, unten: Arthritis-Maus)**

### **4.3. Speicherung von Katecholaminen in arthritischen Pfoten**

Durch die Färbung der Pfoten der an Arthritis erkrankten Tiere konnte die Anwesenheit von Zellen, welche Katecholamine aufnehmen und speichern, aufgezeigt werden. Vergleichbar mit den Erkenntnissen, die bezüglich der Zelldichte in lymphoiden Organen gewonnen wurden, war auch in den Gelenken die Dichte der VMAT-2+ Zellen höher bei den Arthritis-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Differenz zeigte sich schon während der ersten Tage nach Immunisierung, noch bevor eine Gelenkschwellung klinisch sichtbar war. Das Maximum der Dichte an VMAT-2+ Zellen wurde zwischen Tag 28 und 42 nach Immunisierung erreicht (Abb.18, 19).



**Abb. 18:** Dichte der VMAT-2+ neuronalen Zellen in den Gelenken bei Mäusen mit induzierter Arthritis (rot) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiß). Die Daten sind mittels Boxplots dargestellt, diese repräsentieren die 25., 50. (Median) und 75. Perzentile. Die Scatterplots (runde Punkte) stellen die einzeln erfassten Werte dar (n=6 Mäuse pro Gruppe). \*\* =  $p < 0.005$ .



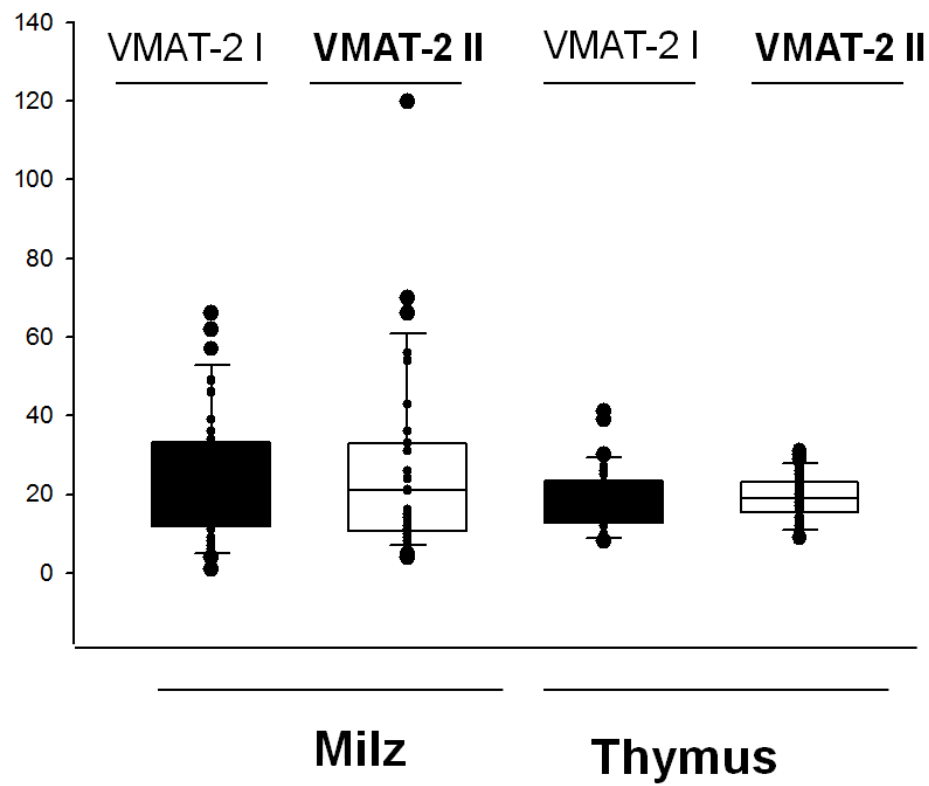
**Abb. 19: Zunahme der Dichte der VMAT-2+ Zellen in arthritischen Pfoten im zeitlichen Verlauf (oben links: Tag 28, oben rechts: Tag 42, unten links: Tag 60, oben rechts: Tag 80). Zur übersichtlicheren Darstellung des Gelenkspaltes wurden diese Bilder in einer geringeren Vergrößerung aufgenommen. Die Auszählung erfolgte, wie bei den oben gezeigten Organen auch, in 400-facher Vergrößerung der Schnitte.**

## **4.4. Ergebnisse der Doppelfärbungen**

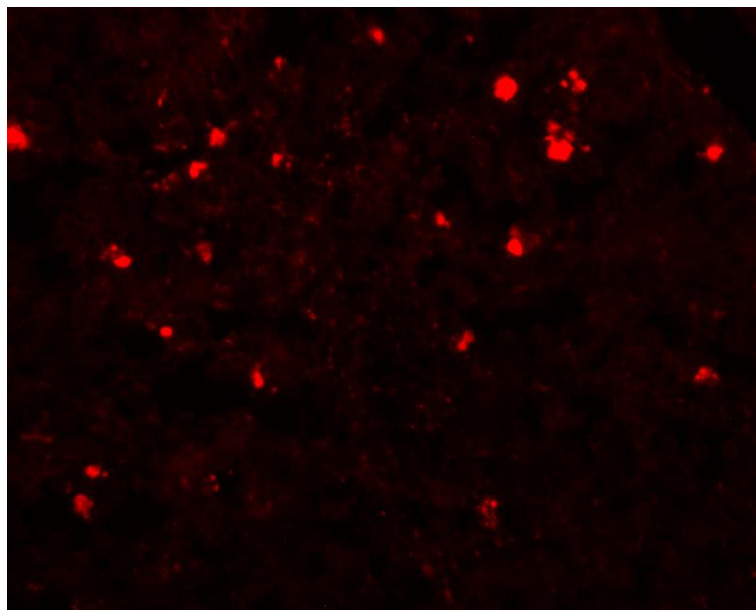
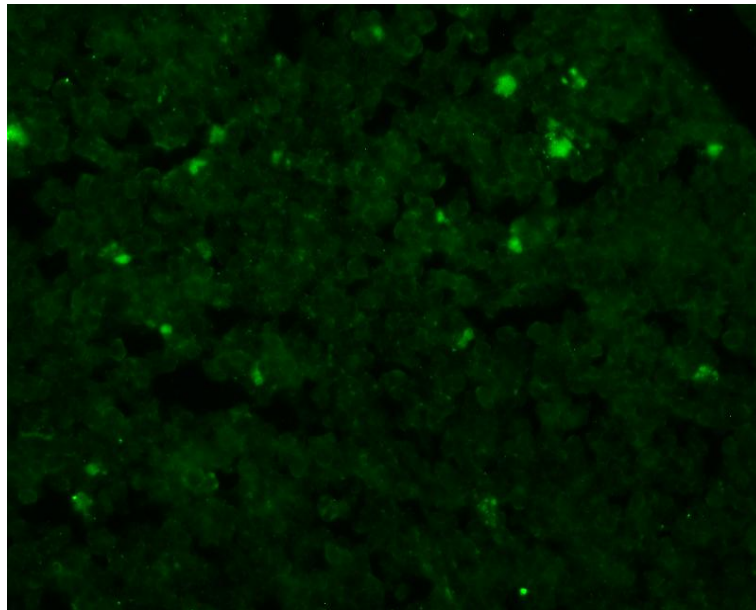
### **4.4.1. Doppelfärbung VMAT-2 $\leftrightarrow$ VMAT-2**

Die Doppelfärbungen wurden repräsentativ an Thymus und Milz durchgeführt. Hierbei zeigte sich zunächst eine nahezu übereinstimmende Zahl der Zellen, die mit Hilfe der beiden anti-VMAT-2 Antikörper angefärbt wurden. Bezüglich der Anfärbung von katecholaminspeichernden Zellen zeigten also beide Antikörper eine nahezu gleichwertige Detektion (Abb. 20, 21).





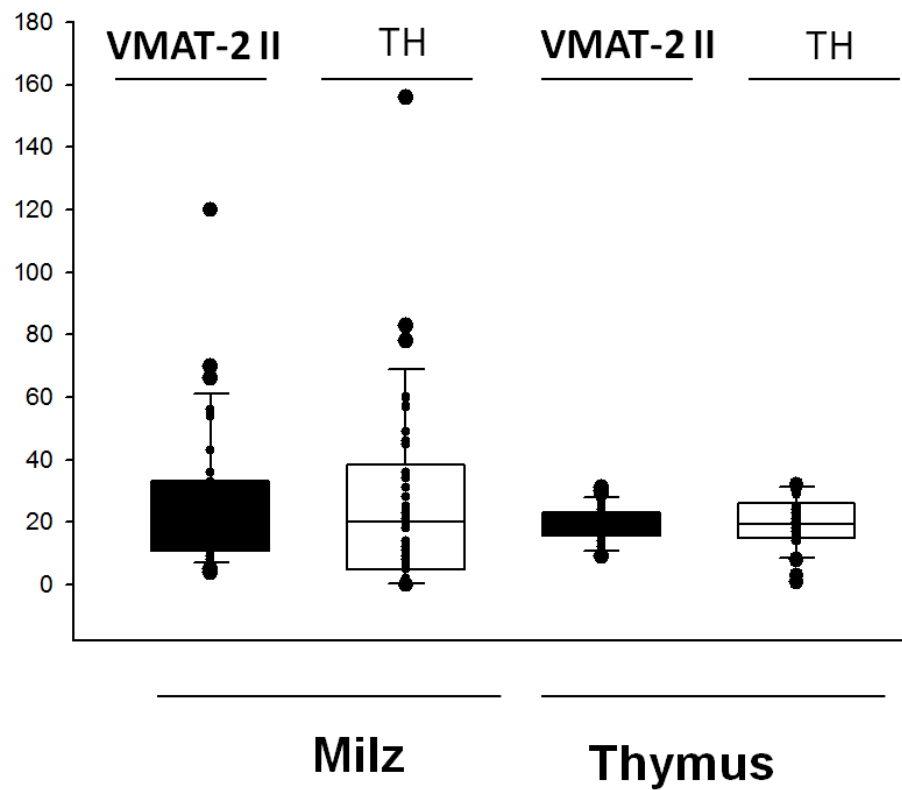
**Abb. 20:** Dichte der katecholaminspeichernden Zellen (schwarz: anti-VMAT-2 I Antikörper, weiß: anti-VMAT-2 II Antikörper). Die Doppelfärbungen erfolgten repräsentativ an Milz und Thymus.



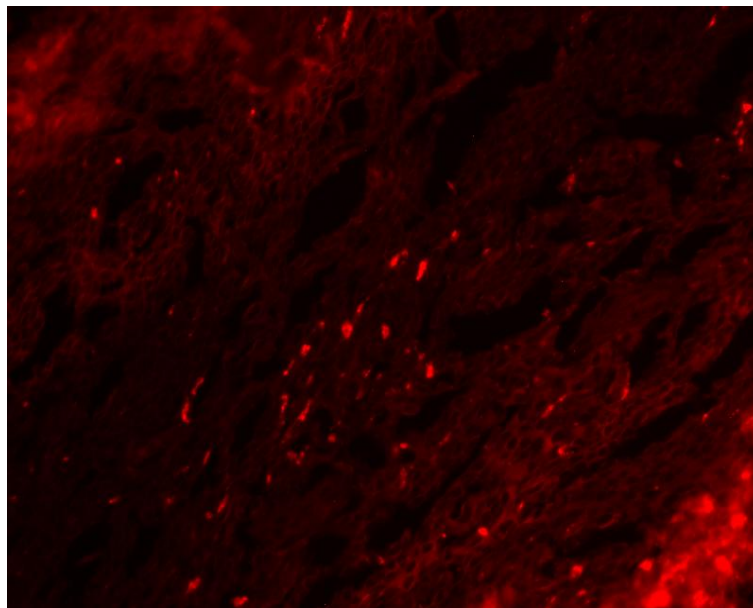
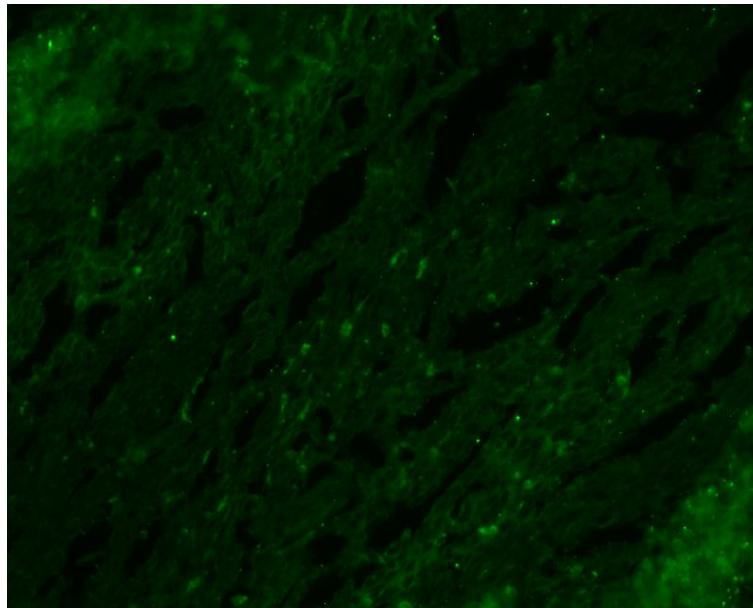
*Abb. 21: Repräsentatives Bild der Doppelfärbung mit beiden anti-VMAT-2 Antikörpern an Tag 35 im Thymus. Die rote Immunfluoreszenz entspricht Antikörper I, die grüne Immunfluoreszenz Antikörper II.*

#### **4.4.2. Doppelfärbung VMAT-2 $\leftrightarrow$ TH**

Auch bei den Doppelfärbungen mit einem anti-VMAT-2 und einem anti-TH-Antikörper konnte eine nahezu übereinstimmende Zelldetektion gefunden werden. Somit entsprach die Zahl der katecholaminproduzierenden (TH+) der Zahl der katecholaminspeichernden (VMAT-2+) Zellen. Auch diese Färbungen wurden exemplarisch an Thymus und Milz durchgeführt (Abb. 22, 23).



**Abb. 22:** Dichte der katecholaminspeichernden Zellen (schwarz: anti-VMAT-2 II Antikörper, weiß: anti-TH Antikörper). Die Doppelfärbungen erfolgten repräsentativ an Milz und Thymus.



**Abb. 23:** Repräsentatives Bild der Doppelfärbung mit einem anti-VMAT-2 Antikörpern und einem anti-TH-Antikörper an Tag 42 in der Milz. Die rote Immunfluoreszenz entspricht dem anti-TH Antikörper, die grüne Immunfluoreszenz dem anti-VMAT-2 Antikörper.

## 5. Diskussion

In den vergangenen Jahren konnte die Pathophysiologie der RA mit Hilfe immunologischer und molekularbiologischer Techniken und Untersuchungsansätze weiter erforscht und einige Aspekte besser verstanden werden. Zahlreiche zentrale Vorgänge der Pathogenese der RA sind noch immer unbekannt, trotz der bisherigen zahlreichen und vielversprechenden Ergebnisse. Dazu gehören beispielsweise Mechanismen zur Entstehung und Progression der RA, der symmetrischen Ausbreitung der Erkrankung sowie die Rolle des SNS im Krankheitsverlauf.

In den letzten Jahrzehnten untersuchten viele *in vivo* und *in vitro* Studien die Auswirkungen des SNS auf die Immunantwort. Diese Studien beschrieben, dass das SNS auf sehr unterschiedliche Art und Weise auf Immunantwort und Entzündungsreaktion einwirken kann; das SNS kann sogar gegenteilige Effekte auslösen. Die Art der Wirkung hängt von mehreren Faktoren ab. Erstens vom Typ der Immunantwort, ob T Helferzellen Typ1 (TH1) oder TH2, ob angeboren oder erworben (60, 61), zweitens von den beteiligten Zelltypen, die eine variable Adrenozeptorexpression haben (62), drittens vom Zeitpunkt der Immunantwort im Verhältnis zur Immunisierung (10), viertens vom erforschten Krankheitsmodell und fünftens von der Lokalisation des sympathischen Einflusses (63). Nun ist eine neue Stufe der Verflechtung erreicht, da auch periphere Zellen Neurotransmitter produzieren können, welche die Immunantwort über autokrine oder parakrine Mechanismen beeinflussen können (64-68). Die Rolle dieser Neurotransmitter-produzierenden Zellen im Rahmen der Immunantwort ist aktueller Gegenstand der Forschung (69).

Zum Beispiel exprimieren humane T regulatorische Lymphozyten (Tregs) im Wesentlichen TH, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Katecholaminsynthese, und sie speichern

bedeutende Mengen an Katecholaminen, welche bei der Behandlung mit Reserpin freigesetzt werden („single-shot“ Reserpin-Effekt) (70). Die Katecholaminfreisetzung resultiert in einer reduzierten Produktion von Interleukin-10 und transforming growth factor  $\beta$  durch Treg Zellen und in einer zunehmenden Proliferation von Effektor T-Lymphozyten, welche unabhängig vom Einfluss durch TNF oder Interferon- $\gamma$  sind (30). Deshalb arbeiten zelluläre Katecholamine in einer autokrinen/ parakrinen Schleife (70). Andere zeigten auch die funktionellen Effekte von Katecholamin-produzierenden Zellen auf (66). Diese Studien bewiesen den immunstimulierenden Effekt von Katecholaminen, welche vom involvierten Zelltyp abzuhängen scheinen, da ebenso auch immun-inhibitorische Effekte dargelegt wurden.

Diesbezüglich konnte kürzlich aufgezeigt werden, dass Makrophagen und Fibroblasten, welche aus menschlichem Synovialgewebe isoliert wurden, Katecholamine produzieren können. Dafür sind diese Zellen mit Katecholamin-synthetisierenden Enzymen ausgestattet (15). Bedeutenderweise besaßen die T-Lymphozyten oder Neutrophilen im Synovialgewebe von Patienten mit RA oder OA diese Ausstattung zur Katecholaminsynthese nicht. Im Rahmen dieser Studien wurde auch aufgezeigt, dass Reserpin, das eine kurze Freisetzung der Katecholamine induziert, nachhaltig die TNF-Produktion der zusammengemischten Synovialzellen inhibierte (15). In Zusammenschau dieser Forschungsergebnisse und unter Beachtung der beschriebenen bimodalen Effekte der Sympathektomie auf die experimentell-induzierte Arthritis (10), wurde angenommen, dass die Technik der chemischen Sympathektomie mit 6-OHDA die Katecholamin-speichernden und -produzierenden Zellen beeinflusst haben könnte. Die Dichte der TH+-Zellen in unserem Arthritis-Modell war bereits während der asymptomatischen Frühphase der Arthritis erhöht, aber die höchste Dichte der TH+-Zellen zeigte sich erst später während der symptomatischen Phase. Wir können nicht den Zeitpunkt des Anstiegs von TH+-Zellen beim Menschen definieren, aber während der Spätphase der Erkrankung stieg die Dichte der TH+-Zellen im Synovialgewebe an (15). Der Zeitraum von Tag 28 bis Tag 42 ist bedeutend bei CIA, da zum gleichen Zeitpunkt

sympathische Nervenfasern verloren gehen (71). Demzufolge gehen sympathische Nervenfasern verloren, wenn TH+ oder VMAT-2+ Zellen drastisch im entzündeten Gewebe ansteigen. Von diesem Gesichtspunkt aus kann man spekulieren, dass sympathische Nervenfasern durch TH+-katecholaminerge Zellen ersetzt werden, um hauptsächlich eine lokale Regulation des Katecholamineinflusses zu ermöglichen. Dies würde eine Isolation des Gewebes vom Einfluss des zentralen Nervensystems bedeuten. Interessanterweise kann so eine Stimulierung der Katecholaminfreisetzung (z.B. durch Reserpin) einen antiinflammatorischen Einfluss auf das Synovialgewebe haben (15).

In Zusammenschau all dieser Informationen beginnen wir die bimodale Rolle einer chemischen Sympathektomie, wie sie im CIA-Modell gezeigt wurde, zu verstehen (10). In der Frühphase der experimentell induzierten Arthritis sind sympathische Nervenfasern noch in den Gelenken vorhanden, und es zeigt sich eine nur geringfügig ansteigende Zahl an TH+/VMAT-2+ Zellen. Daher hat eine chemische Sympathektomie ihren Haupteinfluss auf die sympathischen Nervenfasern. Demzufolge hat eine Sympathektomie vor Ausbruch der Krankheitssymptome einen anti-inflammatorische Effekt, dies deutet daraufhin, dass das SNS eine proinflammatorische Rolle spielt. Diese Erkenntnis erhärtet die Resultate aus früheren Studien bezüglich der frühen Phase der experimentellen Arthritis (72). Allerdings zerstört während der symptomatischen Phase der Erkrankung eine chemische Sympathektomie TH+-Zellen, sie kann jedoch nicht die lokale sympathische Innervation der Gelenke beeinflussen, da die sympathischen Nervenfasern zu diesem Zeitpunkt bereits verloren gegangen sind. Die Verschlimmerung des Krankheitsbildes der experimentell induzierten Arthritis nach der späten Sympathektomie, könnte daher ein Hinweis dafür sein, dass die TH+/ VMAT-2+ katecholaminergen Zellen anti-inflammatorisch sind. Zukünftige Studien müssen weiter eine ähnliche anti-inflammatorische Rolle der TH+/ VMAT-2+- Zellen im Tiermodell der CIA wie auch beim Menschen mit RA aufzeigen.



## **6. Zusammenfassung**

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist primär eine chronische Entzündung der Gelenke, die in ihrem Verlauf zur Knorpel- und Knochendestruktion führt. Die Erkrankung beginnt in einzelnen Gelenken, breitet sich jedoch zunehmend aus und kann alle Gelenke betreffen. Auf die Pathogenese der RA nehmen eine Vielzahl verschiedener Faktoren Einfluss. Die Untersuchungen der letzten Jahre konnten dabei eine enge Verknüpfung zwischen dem Nervensystem und dem endokrinen System aufzeigen. Des Weiteren konnte auch ein Zusammenspiel mit dem Immunsystem nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich weitgehende Einflüsse des SNS auf immunkompetente Zellen. All diese Forschungsergebnisse trugen viel zum Verständnis der Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis bei.

In der vorliegenden Arbeit konnte erneut gezeigt werden, dass sich mittels einer Kollagen Typ II - induzierten Arthritis im Mausmodell die pathophysiologischen Vorgänge gut erfassen lassen. Dazu wurde ein etablierter Gelenkscore verwendet, welcher es ermöglichte, die klinisch sichtbaren Veränderungen zu objektivieren. Auch histologisch konnte man die fortschreitende Gelenkzerstörung gut nachzuvollziehen.

Im einem weiteren Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zahl der katecholaminproduzierenden (TH+) und der katecholaminspeichernden (VMAT-2+) Zellen übereinstimmte. Somit ist es legitim, die Begriffe katecholaminproduzierend und katecholaminspeichernd synonym zu verwenden.

Im Hauptteil der Arbeit wurde das Auftreten und die Lokalisation der katecholaminproduzierenden und –speichernden Zellen in verschiedenen Organen sowie in den Gelenken von Mäusen nach der Induktion von Kollagen Typ II – induzierter Arthritis untersucht. Es wurde die Zelldichte in den Organen zu verschiedenen Zeitpunkten bei

Arthritis-Mäusen im Vergleich mit einer Kontrollgruppe untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass Katecholamin-produzierende und –speichernde Zellen in den verschiedenen Organen bereits vor Ausbruch der klinischen Symptomatik (Tag 5 bis 21) zahlreich vorhanden waren. Insbesondere in den drainierenden Lymphknoten, im Thymus und in den Gelenken waren sie erhöht. Die Dichte der TH+ und VMAT-2+ Zellen war am höchsten nach Ausbruch der klinischen Symptome der Arthritis (fortschreitend ab Tag 28). Es konnte beobachtet werden, dass die Zellen in folgender Reihenfolge auftraten: Lymphknoten, Thymus, Gelenke, Knochenmark und Milz. Somit konnte dargelegt werden, dass es eindeutig zu Veränderungen des Nervensystems im lokalen Entzündungsmilieu kommt, was durch die Zunahme der Katecholamin-produzierenden und –speichernden Zellen deutlich wird. Das sympathische Nervensystem nimmt zu verschiedenen Zeitpunkten des Entzündungsprozesses unterschiedliche Rollen hinsichtlich einer anti- bzw. einer proinflammatorischen Wirkung ein; dieser vielschichtige Regulationsmechanismus wurde bereits in zahlreichen Voruntersuchungen aufgezeigt. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Zunahme der Entzündung mit der Zunahme katecholaminproduzierender und –speichernder Zellen korreliert. Dazu passt die anti-inflammatorische Rolle, die den katecholaminergen Zellen bereits in früheren Studien zugeschrieben wurde. In diesem Zusammenhang ist die anti-inflammatorische Rolle, die sympathische Nervenfasern während der Spätphase der Arthritis spielen, wahrscheinlich abhängig von der Zelleliminierung durch chemische Sympathektomie. Dies bestätigt auch frühere Annahmen unseres Instituts.

## 7. Literaturverzeichnis

- (1) Kesztyus L, Szilagyi T, Gyulai F. Nervous system and immunity. Effect of barbiturate sleep on titer of immune bodies in the blood. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 1954; 1:359-70.
- (2) Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, Carlson SL, Ackerman KD, Madden KS, Olschowka JA, Livnat S. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev* 1987; 100:225-60.
- (3) Madden KS, Stevens SY, Felten DL, Bellinger DL. Alterations in T lymphocyte activity following chemical sympathectomy in young and old Fischer 344 rats. *J Neuroimmunol* 2000;103:131–45.
- (4) Kavelaars A, van de PM, Zijlstra J, Heijnen CJ. Beta 2-adrenergic activation enhances interleukin-8 production by human monocytes. *J Neuroimmunol* 1997; 77:211-6.
- (5) Rose FR, Hirschhorn R, Weissmann G, Cronstein BN. Adenosine promotes neutrophil chemotaxis. *J Exp Med* 1988; 167:1186-94.
- (6) Schedlowski M, Hosch W, Oberbeck R, Benschop RJ, Jacobs R, Raab HR, Schmidt RE. Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent beta 2-adrenergic mechanisms. *J Immunol* 1996; 156:93-9.
- (7) Straub RH, Mayer M, Kreutz M, Leeb S, Schölmerich J, Falk W. Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes. *J Leukoc Biol* 2000; 67:553-8.
- (8) Keyszer G, Langer T, Kornhuber M, Taute B, Horneff G. Neurovascular mechanisms as a possible cause of remission of rheumatoid arthritis in hemiparetic limbs. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1349-51.
- (9) Levine JD, Goetzi EJ, Basbaum AI. Contribution of the nervous system to the pathophysiology of rheumatoid arthritis and other polyarthritides. *Rheum Dis Clin North Am* 1987; 13:369-83.
- (10) Härle P, Möbius D, Carr DJ, Schölmerich J, Straub RH. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52:1305-13.

- (11) Ferrero S, Haas S, Remorgida V, Camerini G, Fulcheri E, Ragni N, Straub RH, Capellino S. Loss of sympathetic nerve fibers in intestinal endometriosis. *Fertil Steril* 2010; 94:2817-9.
- (12) Lehner B, Koeck FX, Capellino S, Schubert TE, Hofbauer R, Straub RH. Preponderance of sensory versus sympathetic nerve fibers and increased cellularity in the infrapatellar fat pad in anterior knee pain patients after primary arthroplasty. *J Orthop Res* 2008; 26(3):342-50.
- (13) Straub RH, Grum F, Strauch U, Capellino S, Bataille F, Bleich A, Falk W, Schölmerich J, Obermeier F. Anti-inflammatory role of sympathetic nerves in chronic intestinal inflammation. *Gut* 2008; 57(7):911-21.
- (14) Weidler C, Holzer C, Harbuz M, Hofbauer R, Angele P, Schölmerich J, Straub RH. Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(1):13-20.
- (15) Capellino S, Cosentino M, Wolff C, Schmidt M, Grifka J, Straub RH. Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(10):1853-60.
- (16) 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(13):2097-107.
- (17) Gay S., Gay RE, Koopmann WJ. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 39-47.
- (18) Elliot MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katasikis P, Brennan FM, Bijl H, Ghrayeb J, Woody JN. Repeated therapy with monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994; 334: 1125-1127.
- (19) Gabay C, Marinova-Mafchieva L, Williams RO, Gigley JP, Butler DM, Feldmann M, Arend WP. Increased production of intracellular interleukin-1 receptor antagonist type I in the synovium of mice with collagen induced arthritis: A possible role in the resolution of arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 451-462.
- (20) Keffer J, Probert L, Caziaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G 1991: Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *The Embo Journal* 10, 4025-4031.
- (21) Bingham CO 3<sup>rd</sup>. Emerging therapeutics for rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2008; 66(3):210-5.

- (22) Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000; 2(5):361-7.
- (23) Pap T, Meinecke I, Müller-Ladner U, Gay S. Are fibroblasts involved in joint destruction? *Ann Rheum Dis.* 2005 Nov; 64 Suppl. 4: 52-4.
- (24) Karouzakis E, Neidhart M, Gay RE, Gay S. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol Lett.* 2006 Jul 15; 106(1):8-13.
- (25) Sobotta J, Welsch U: *Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie.* Elsevier GmbH München 2003.
- (26) Lüllmann-Rauch R: *Histologie. Verstehen-Lernen-nachschlagen.* Georg-Thieme-Verlag Stuttgart 2003.
- (27) Zvaifler NJ, Firestein GS. Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1994 Jun; 37(6): 783-9.
- (28) Bodolay E, Koch AE, Kim J, Szegedi G, Szekanecz Z. Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases. *J Cell Mol Med.* 2002 Jul-Sep;6(3): 357-76.
- (29) H. G. Fassbender: Normal and pathological synovial tissue with emphasis on rheumatoid arthritis In: *Rheumatology and Immunology*, 2nd Ed. (ed. A.S. Cohen and J.C. Bennett), Orlando-New York: Grüne & Stratton, 1986, 36-42.
- (30) Straub RH (Hg.): *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen.* Vandenhoeck & Ruprecht 2006.
- (31) Hynes RO. Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily. *Curr Opin Genet Dev.* 1992 Aug; 2(4):621-4
- (32) Postigo AA, García-Vicuña R, Laffón A, Sánchez-Madrid F: The role of adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity.* 1993; 16(1):69-76.
- (33) Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Oct; 15(5):509-14.
- (34) French-Constant C, Colognato H. Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends Cell Biol.* 2004 Dec; 14(12):678-86.
- (35) Tran NL, Adams DG, Vaillancourt RR, Heilmann RL. Signal transduction from N-cadherin increases Bcl-2. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by homophilic adhesion and actin cytoskeletal organization. *J Biol Chem.* 2002 Sep 6; 277(36):32905-14.
- (36) Silverman MD, Haas CS, Rad AM, Arbab AS, Koch AE. The role of vascular cell adhesion molecule 1/ very late activation antigen 4 in endothelial progenitor cell recruitment to rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum.* 2007 Jun; 56(6):1817-26.

- (37) Bombara MP, Webb DL, Conrad P, Marlor CW, Sarr T, Ranges GE, Aune TM, Greve JM, Blue ML. Cell contact between T cells and synovial fibroblasts causes induction of adhesion molecules and cytokines. *J Leukoc Biol.* 1993 Nov; 54(5):399-406.
- (38) Morales-Ducret J, Wayner E, Elices MJ, Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Firestein GS. Alpha 4/beta 1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol.* 1992 Aug 15; 149(4):1424-31.
- (39) Kriegsmann J, Keyszer GM, Geiler T, Lagoo AS, Lagoo-Deenadayalan S, Gay RE, Gay S. Expression of E-selectin messenger RNA and protein in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995 Jun; 38(6):750-4.
- (40) Piriälä L, Aho H, Roivainen A, Kontinen YT, Pelliniemi LJ, Heino J. Identification of alpha6-beta1-integrin positive cells in synovial lining layer as type B synoviocytes. *J Rheumatol.* 2001 Mar; 28(3):478-84
- (41) Silverman MD, Haas CS, Rad AM, Arbab AS, Koch AE. The role of vascular cell adhesion molecule 1/ very late activation antigen 4 in endothelial progenitor cell recruitment to rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum.* 2007 Jun; 56(6):1817-26.
- (42) Gabor M. Rubanyi (Hrsg.): Angiogenesis in health and disease. Basic mechanisms and clinical applications. Dekker, New York 2000
- (43) Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2001 Sep 15; 358(9285):903-11.
- (44) Fearon U, Griosios K, Fraser A, Reece R, Emery P, Jones PF, Veale DJ. Angiopoietins, growth factors, and vascular morphology in early arthritis. *J Rheumatol.* 2003 Feb; 30(2):260-8.
- (45) Szekanecz Z, Koch AE. Analysis of inflammatory leukocyte and endothelial chemotactic activity. *Methods Mol Med.* 2007; 135:359-64.
- (46) Szekanecz Z, Koch AE. Mechanisms of Disease: angiogenesis in inflammatory diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007 Nov; 3(11):635-43
- (47) Hartlapp I, Abe R, Saeed RW, Peng T, Voelter W, Bucala R, Metz CN. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *FASEB J.* 2001 Oct;15(12):2215-24.
- (48) Veale DJ, Fearon U. Inhibition of angiogenic pathways in rheumatoid arthritis: potential for therapeutic targeting. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006 Oct; 20(5):941-7.
- (49) Akhavan MA, Madden L, Buysschaert I, Sivakumar B, Kang N, Paleolog EM. Hypoxia upregulates angiogenesis and synovial cell migration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11(3):R64.
- (50) Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science.* 1994 Apr 22; 264(5158):569-71.

- (51) Cotran RS, Pober JS. Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury. *J Am Soc Nephrol*. 1990 Sep; 1(3):225-35
- (52) Hübner G, Werner S. Serum growth factors and proinflammatory cytokines are potent inducers of activin expression in cultured fibroblasts and keratinocytes. *Exp Cell Res*. 1996 Oct 10; 228(1):106-13
- (53) Quan TE, Cowper S, Wu SP, Bockenstedt LK, Bucala R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr; 36(4):598-606.
- (54) Moore BB, Kolodsick JE, Thannickal VJ, Cooke K, Moore TA, Hogaboam C, Wilke CA, Toews GB. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am J Pathol*. 2005 Mar; 166(3):675-84.
- (55) Jänig W, Levine JD, Michaelis M. Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Prog Brain Res* 1996; 113:161-84.
- (56) Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Sarma JV, Day DE, Lentsch AB, Huber-Lang MS, Ward PA. Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. *PLoS One* 2009; 4:4414.
- (57) Straub RH, Härle P. Sympathetic neurotransmitters in joint inflammation; *Rheum Dis Clin North Am* 2005; 31:43-59.
- (58) Kölby L, Bernhardt P, Levin-Jakobsen AM, Johanson V, Wangberg B, Ahlman H et al. Uptake of meta-iodobenzylguanidine in neuroendocrine tumours is mediated by vesicular monoamine transporters. *Br J Cancer* 2003; 89(7): 1383-8.
- (59) Margaret J. Cook M.R.C.: *The Anatomy of the Laboratory Mouse* Laboratory Animals Centre Carshalton, Surrey, England, Academic Press 1965
- (60) Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress system--organization, physiology and immunoregulation. *Neuroimmunomodulation* 2006; 13(5-6):257-67.
- (61) Rice PA, Boehm GW, Moynihan JA, Bellinger DL, Stevens SY. Chemical sympathectomy increases the innate immune response and decreases the specific immune response in the spleen to infection with *Listeria monocytogenes*. *J Neuroimmunol* 2001; 114(1-2):19-27.
- (62) McAlees JW, Smith LT, Erbe RS, Jarjoura D, Ponzio NM, Sanders VM. Epigenetic regulation of beta2-adrenergic receptor expression in T(H)1 and T(H)2 cells. *Brain Behav Immun* 2011; 25(3):408-15.
- (63) Lorton D, Lubahn C, Klein N, Schaller J, Bellinger DL. Dual role for noradrenergic innervation of lymphoid tissue and arthritic joints in adjuvant-induced arthritis. *Brain Behav Immun* 1999; 13(4):315-34.

- (64) Bergquist J, Tarkowski A, Ekman R, Ewing A. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(26):12912-6.
- (65) Cosentino M, Marino F, Bombelli R, Ferrari M, Lecchini S, Frigo G. Endogenous catecholamine synthesis, metabolism, storage and uptake in human neutrophils. *Life Sci* 1999; 64(11):975-81.
- (66) Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS et al. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 2007; 449(7163):721-5.
- (67) Marino F, Cosentino M, Bombelli R, Ferrari M, Lecchini S, Frigo G. Endogenous catecholamine synthesis, metabolism storage, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells. *Exp Hematol* 1999; 27(3):489-95.
- (68) Musso NR, Brenci S, Setti M, Indiveri F, Lotti G. Catecholamine content and in vitro catecholamine synthesis in peripheral human lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(10):3553-7.
- (69) Franco R, Pacheco R, Lluís C, Ahern GP, O'Connell PJ. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends Immunol* 2007; 28(9):400-7.
- (70) Cosentino M, Fietta AM, Ferrari M, Rasini E, Bombelli R, Carcano E, Saporiti F, Meloni F, Marino F, Lecchini S. Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood* 2007; 109(2):632-42.
- (71) Straub RH, Rauch L, Fassold A, Lowin T, Pongratz G. Neuronally released sympathetic neurotransmitters stimulate splenic interferon-gamma secretion from T cells in early type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58(11):3450-60.
- (72) Levine JD, Dardick SJ, Roizen MF, Helms C, Basbaum AI. Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. *J Neurosci* 1986; 6(12):3423-9.



## 8. Abbkürzungsverzeichnis

<b>6OHDA</b>	6-Hydroxydopamin
<b>b FGF</b>	basic fibroblast growth factor
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	circa
<b>CIA</b>	Kollagen-Typ II-induzierte Arthritis
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
<b>DBH</b>	Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase
<b>DOPA</b>	Dihydroxyphenylalanin
<b>EZM</b>	extrazelluläre Matrix
<b>FGF</b>	fibroblast growth factor
<b>ICAM</b>	intercellular adhesion molecule
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IL</b>	Interleukin
<b>M-CSF</b>	macrophagecolony stimulating factor
<b>MMP</b>	Matrixmetalloproteinase
<b>NA</b>	Noradrenalin
<b>OA</b>	Osteoarthrose
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>PDGF</b>	platelet derived growth factor
<b>PNMT</b>	Phenylethanolamin-N-Methyltransferase
<b>RA</b>	rheumatoide Arthritis
<b>SNS</b>	sympathisches Nervensystem
<b>TGF <math>\beta</math></b>	transforming growth factor $\beta$
<b>TH</b>	Tyrosinhydroxylase
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>u. a.</b>	unter anderem

<b>u. U.</b>	unter Umständen
<b>v. a.</b>	vor allem
<b>VCAM</b>	vascular cell adhesion molecule
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor
<b>VMAT-2</b>	vesikulärer Monoamintransporter-2
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>ZNS</b>	Zentralnervensystem

## **9. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rainer H. Straub, der mich zu jeder Zeit als Berater und Unterstützer begleitet hat.

Des Weiteren geht mein besonderer Dank an meine Betreuerin Frau Dr. Silvia Capellino, die mir die Grundlagen der Laborarbeit beibrachte und immer wieder konstruktive Kritik an meiner Arbeit leistete.

Auch sind viele Experimente nur durch die Unterstützung und ausführliche Erklärung durch die Mitarbeiter des Labors zustande gekommen, ein herzliches Dankeschön an alle, besonders an Luise Rauch, Dr. Christine Wolff und Dr. Alexander Faßold.

Jörg Grädler danke ich herzlichst für die Ratschläge zur Bearbeitung der Grafiken in dieser Arbeit.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, gilt der größte Dank, da sie mir die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglichten. Nicht nur in schwierigen Momenten hielten sie mir den Rücken frei und hatten Verständnis, wenn ich aufgrund der Arbeit nicht zu Hause sein konnte.

Ein weiteres herzliches Dankeschön geht an meine Kollegin Frau Dr. Carola Schum für das Korrekturlesen der Arbeit und das Entdecken auch der kleinsten Rechtschreibfehler.

Zu guter Letzt geht mein innigster Dank an meinen zukünftigen Mann Christoph, der selbst am besten weiß, dass das Gelingen dieser Arbeit zum allergrößten Teil auch sein Verdienst war. Dankeschön für deine Engelsgeduld mit mir.

## 10. Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Kristina Weber  
Geburtsdatum: 08. April 1986  
Geburtsort: Sulzbach-Rosenberg (Bayern)  
Familienstand: ledig

### AUSBILDUNG

---

09/1992 - 08/1996	Pestalozzi-Grundschule, Sulzbach-Rosenberg
09/1996 - 06/2005	HCA Gymnasium, Sulzbach-Rosenberg - Abitur

### STUDIUM

---

10/2005 - 08/2007	Universität Regensburg - Studium der Humanmedizin - vorklinischer Studienabschnitt
09/2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2007 – 10/2011	Uniklinikum Regensburg - klinischer Studienabschnitt
10/2011	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/2011	Approbation als Ärztin

### BERUFSTÄTIGKEIT

---

seit 12/2011	Assistenzärztin in der Abteilung für Pädiatrie am Klinikum Sankt Marien in Amberg
--------------	--

## **11. Erklärung an Eidesstaat**

Hiermit versichere ich, Kristina Weber, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Sulzbach-Rosenberg, Juli 2012

Kristina Weber



## **12. Publikation**

Silvia Capellino\*, Kristina Weber\*, Magdalena Gelder\*, Peter Härle, and Rainer H. Straub

\*geteilte Erstautorenschaft

**First Appearance and Location of Catecholaminergic Cells during Experimental Arthritis and Elimination by Chemical Sympathectomy**

Arthritis Rheum. 2012; 64:1110-8. doi: 10.1002/art.33431. Epub 2011 Oct 27.