

**Modulation der zellulären Eigenschaften und Osteoklastogenese von
Knochenmark-Makrophagen durch Kollagen Typ II-induzierte Arthritis
und sympathische Neurotransmitterstimulation**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Dominique Muschter
aus
Lauchhammer

Im Jahr
2015

**Modulation der zellulären Eigenschaften und Osteoklastogenese von
Knochenmark-Makrophagen durch Kollagen Typ II-induzierte Arthritis
und sympathische Neurotransmitterstimulation**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Dominique Muschter
aus
Lauchhammer

Im Jahr
2015

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Grässel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Rheumatoide Arthritis	1
1.1.1	Tiermodell: Kollagen Typ II-induzierte Arthritis	5
1.2	Osteoklasten.....	7
1.2.1	Osteoklasten-vermittelte Pathophysiologien.....	11
1.2.2	Pathomechanismen der Osteoklastenaktivierung in RA	12
1.3	Das periphere sympathische Nervensystem	14
1.3.1	Noradrenalin.....	15
1.3.2	Acetylcholin	18
1.3.3	Vasoaktives intestinales Peptid	20
1.3.4	Die sympathische Innervierung von Knochen und Gelenken und pathophysiologische Mechanismen in der rheumatoiden Arthritis	22
2	Ziel der Arbeit.....	29
3	Material und Methoden.....	31
3.1	Tierexperimentelle Arbeiten.....	31
3.1.1	Versuchstiere.....	31
3.1.2	Kollagen Typ II Arthritis Modell	31
3.1.3	Klinischer Bewertungsmaßstab der experimentellen Arthritis	32
3.2	Zellkultur	32
3.2.1	Isolation und Kultivierung von Knochenmark-Makrophagen	32
3.2.2	<i>In vitro</i> -Osteoklastogenese	34
3.2.3	Neurotransmitter und spezifische Agonisten	34
3.2.4	Herstellung knochenähnlicher Matrix	35
3.2.5	Resorptionsassay	36
3.3	Molekularbiologie	37
3.3.1	RNA Isolierung	37

Inhaltsverzeichnis

3.3.1.1	RNA-Isolierung aus Osteoklasten.....	37
3.3.1.2	RNA-Isolierung aus Makrophagen	37
3.3.2	RNA-Konzentrationsbestimmung, Qualitätsüberprüfung und cDNA-Synthese	37
3.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
3.3.3.1	Qualitative Endpunkt-PCR	38
3.3.3.2	Quantitative real-time PCR.....	41
3.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	42
3.4	Proteinbiochemie	43
3.4.1	Kathepsin K-Enzymassay	43
3.4.2	BrdU Proliferations-Assay	44
3.4.3	Caspase 3/7 Assay	45
3.4.3.1	Knochenmark-Makrophagen	45
3.4.3.2	Osteoklasten.....	45
3.4.4	Kristallviolett-Adhäsionsassay.....	46
3.4.5	Proteinbestimmung in Zellkulturüberständen	46
3.5	Histologie und Immunfluoreszenzfärbung	47
3.5.1	Tartrat-resistente saure Phosphatase-Färbung.....	47
3.5.2	von Kossa-Matrixfärbung	48
3.5.3	Immunfluoreszenzfärbung	48
3.6	Durchflusszytometrische Analysen	49
3.6.1	Zellzyklus	49
3.6.2	Oberflächenmarker und Integrinexpression	50
3.7	Statistische Analyse	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Induktion von Kollagen Typ II-induzierter Arthritis.....	54
4.2	Untersuchungen zu Knochenmark-Makrophagen	55

Inhaltsverzeichnis

4.2.1	Anzahl der isolierten Knochenmark-Makrophagen und Charakterisierung von Oberflächenmarkern	55
4.2.2	Rezeptor-Expression für Acetylcholin, Noradrenalin und vasoaktives intestinales Peptid	58
4.2.3	Adhäsionsverhalten an Plastikoberflächen und Komponenten der extrazellulären Matrix	62
4.2.3.1	Adhäsion an Plastikoberflächen.....	62
4.2.3.2	Adhäsion an Kollagen Typ I, Fibronectin und Laminin und Integrinexpression	64
4.2.4	Proliferation von Knochenmark-Makrophagen	68
4.2.5	Caspase 3/7 Aktivität von Knochenmark-Makrophagen	71
4.3	Untersuchungen zur Osteoklastogenese von Knochenmark-Makrophagen.....	73
4.3.1	Osteoklasten exprimieren Rezeptoren für Acetylcholin, Noradrenalin und vasoaktives intestinales Peptid.....	73
4.3.2	Osteoklastogene Differenzierungskapazität von Knochenmark-Makrophagen.	76
4.3.2.1	Osteoklastenanzahl	76
4.3.2.2	Zellkernanzahl.....	80
4.3.3	Caspase 3/7-Aktivität von Osteoklasten	85
4.3.4	Untersuchungen zur Osteoklastenaktivität.....	89
4.3.4.1	Enzymaktivität von Kathepsin K.....	89
4.3.4.2	Resorption von knochenähnlicher Matrix.....	93
4.3.5	Einfluss cAMP-assoziiierter Signalwege auf Differenzierung und Aktivität	96
5	Diskussion.....	98
5.1	Einfluss von CIA auf metabolische Eigenschaften von Knochenmark-Makrophagen	98
5.2	Einfluß von sympathischer Neurotransmitterstimulation auf metabolische Eigenschaften von Knochenmark-Makrophagen	103
5.3	Einfluß von CIA auf die Osteoklastogenese von Knochenmark-Makrophagen	106

Inhaltsverzeichnis

5.3.1	Genexpressionsanalyse Osteoklasten-assoziiierter Markergene	109
5.4	Einfluss sympathischer Neurotransmitterstimulation auf die Osteoklastogenese von Knochenmark-Makrophagen	111
	Zusammenfassung	117
	Summary	120
	Danksagung	122
	Selbständigkeitserklärung	123
	Curriculum vitae	124
	Veröffentlichungen	126
	Abkürzungsverzeichnis	127
	Literaturverzeichnis	131

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine systemische, entzündliche Erkrankung des Bindegewebssystems mit einer chronischen Verlaufsprognose, die vorrangig diarthroide Gelenke betrifft und zur Zerstörung der Gelenkhaut (Synovia), des Knorpels und des angrenzenden periartikulären Knochengewebes führt. RA gehört zum großen Formenkreis der rheumatoiden Erkrankungen, wo sie die klassische Form der autoimmun-entzündlichen Variante darstellt. Andere Formen autoimmun-entzündlicher Rheumaerkrankungen sind unter anderem die Spondylitis ankylosans (Morbus Bechterew), Psoriasis-Arthritis, juvenile idiopathische Arthritis sowie Kollagenosen (systemischer Lupus erythematoses, Sjögren-Syndrom, Sklerodermie) und Vaskulitiden (z.B. Morbus Wegener). Zusätzliche Kategorien der Rheumaerkrankungen umfassen degenerative rheumatische Erkrankungen (Arthrose), Stoffwechselstörungen mit einhergehenden rheumatischen Beschwerden (z.B. Gicht) oder rheumatische Schmerzerkrankungen der Weichteile („Weichteilrheumatismus“) die Muskulatur und Sehnen betreffen können (z.B. Fibromyalgie). Erste Symptome der RA sind charakterisiert durch Schwellung, Erwärmung und Rötung als typische Entzündungssymptome, der sogenannten Synovitis. Diese manifestieren sich bevorzugt in den Gelenken der Handwurzelknochen, den Fingergrundgelenken (Metacarpophalangealgelenk) sowie den proximalen Interphalangealgelenken. Weniger verbreitet, aber auch zu beobachten, ist das Auftreten von RA in Hand-, Knie-, Ellenbogen-, Schulter-, Zehen-, Fuß- und Hüftgelenken sowie in Bereichen der Halswirbelsäule. Typischerweise treten die Symptome symmetrisch auf. Neben den initialen Entzündungsprozessen führt der weitere Verlauf zur Degeneration von Knorpel- und Knochengewebe in den gelenknahen Bereichen, die schlussendlich Gelenkdeformation und eingeschränkte Beweglichkeit mit massiver Einschränkung der Lebensqualität zur Folge hat. Extra-artikuläre Komorbiditäten der RA können sich in pulmonalen, okularen, kardialen, neuronalen, kutanen, renalen und vaskulären Symptomen manifestieren (1). RA tritt mit einer Prävalenz von 0,5-1% in der Gesamtbevölkerung auf, wobei der Anteil in fortgeschrittenen industrialisierten Nationen höher ist als in Ländern aus Wachstumsregionen (2, 3). Frauen sind etwa dreimal häufiger betroffen als Männer. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt zwischen 40 und 60 Jahren, grundsätzlich kann RA jedoch in jedem Lebensabschnitt auftreten und die Mortalitätsrate von RA-Patienten ist höher als die der gesunden Bevölkerung (4-7).

RA ist eine Autoimmunkrankheit mit multifaktoriellen Ursachen. Hierzu gehören sowohl genetische und immunologische Faktoren, als auch Umweltfaktoren. Die Autoimmun-Hypothese bildet einen wichtigen Pfeiler in der Ätiologie der RA. Bereits 1939 entdeckte Erik Waaler den sogenannten Rheumafaktor (RF) in der Globulin-Fraktion von RA-Patientenserum, der die Agglutination von Schafsblutzellen induzieren konnte (8). Rheumafaktoren bilden eine Klasse von Immunglobulinen (Ig) verschiedener Isotypen (IgA, IgM, IgG), die von B-Zellen synthetisiert werden, und besitzen unterschiedliche Affinitäten gegen körpereigenes IgG und sind ein wichtiger Bestandteil der RA-Diagnostik (9, 10). Im Verlauf der letzten Jahre wurden weitere Autoantikörper mit Spezifitäten gegen citrullinierte Proteine (*anti-citrullinated peptide antibodies*, ACPA), wie z.B. Vimentin, α -Enolase, Fibrinogen oder Kollagen Typ II, carbamoylierte Proteine, Glucose-6-Phosphat-Isomerase, gp39, Filaggrin, *cartilage-specific membrane antigen* CH65, Calpastatin, Calreticulin sowie Kollagen Typ II, beschrieben (11, 12). Autoantikörper wie RF und ACPA können teilweise schon Jahre vor dem Auftreten erster RA-Symptome im Patientenserum nachgewiesen werden (13). ACPA wurden, zusätzlich zum RF, im Jahr 2010 in die RA-Klassifikationskriterien des *American College of Rheumatology* (ACR) und der *European League against Rheumatism* (EULAR) aufgenommen, da ACPA-positive RA vor allem mit schweren Verlaufsformen assoziiert wurde (14, 15). Neben B-Zellen sind auch autoreaktive T-Zellen, deren Reaktivität hauptsächlich gegen citrullinierte Proteine gerichtet ist, an der Pathogenese der RA beteiligt (16-18).

Durch *genome-wide association studies* (GWAS) wurde in den letzten Jahren eine immer noch anwachsende Liste von Genloci identifiziert, die mit einer Prädisposition für RA assoziiert werden (19, 20). Die größte Assoziation für Suszeptibilität und Schweregrad von RA besteht mit spezifischen Allelen des MHC Klasse II-Locus HLA-DRB1, besonders mit den Allelen HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*04 und HLA-DRB1*10, die an Position 70-74 eine bestimmte Aminosäurekombination, das sogenannte „*shared epitope*“, kodieren (21-24). Die Existenz protektiver HLA-DR-Allele, die an dieser Position ein DERAA-Motiv aufweisen, ist bisher nicht eindeutig bewiesen (25, 26). Weitere bekannte, nicht HLA-kodierende Risikogene sind *PTPN22* (*protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22, lymphoid*) (27-29), *STAT4* (*signal transducer and activator of transcription 4*) (29, 30), *PADI4* (*peptidyl arginine deiminase type IV*) (21, 31) sowie *TRAF1* (*TNF-associated factor 1*) (32, 33), *IRAK1* (*interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) (34), *FCGR3A* (*low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-a*) (35), *CTLA4* (*cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*)

(36) und *CYB5A* (*cytochrome b5*) (37). Je nach ethnischer Herkunft können verschiedene Gene das Risiko für RA bestimmen. So wurde in Studien aus Kanada, Europa und den USA eine starke Assoziation mit *PTPN22* gefunden, während in asiatischen Populationen eher der Polymorphismus von *PADI4* mit einer stärkeren RA-Prädisposition assoziiert ist (38-42).

Neben genetischen Ursachen, die etwa 50-60% des Risikos an RA zu erkranken ausmachen (43), wird auch verschiedenen Umweltfaktoren eine große Rolle zugeschrieben. Eine Hypothese geht von mikrobiellen Stimuli (*Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, Mycoplasmen, *Proteus mirabilis* und *Klebsiella pneumonia*) als auslösendem Agens für RA aus, die bisher aber nicht ausreichend wissenschaftlich belegt wurde (44, 45). Infektionen mit *Porphyromonas gingivalis*, dem Hauptverursacher von Periodontitis, zeigen dagegen eine große Korrelation mit der Inzidenz von RA (46). Einige Forscher haben eine Beteiligung der natürlichen mikrobiologischen Flora an der Pathogenese von RA postuliert, aber auch für diese These gibt es bisher keine eindeutigen Beweise (47, 48). Weiterhin werden virale Infektionen mit Parvovirus B19 (49, 50), Cytomegalievirus (51), humanen endogenen Retroviren (52) und vor allem dem Epstein-Barr-Virus (EBV) (53) als Auslöser für RA in Betracht gezogen, obwohl die Erforschung grundlegender Mechanismen weiterer Studien bedarf. Neueste Forschungsergebnisse zeigen eine mögliche Kreuzreaktion von Antikörpern gegen citrullinierte EBV-Proteine mit citrullinierten körpereigenen Proteinen (54).

Weitere Umweltfaktoren wie Rauchen (55), Übergewicht (56), Alkohol- und Kaffeekonsum, Vitamin D-Mangel, Hormonlevel, sowie der sozioökonomische Status eines Individuums können die Entstehung von RA beeinflussen (57). Auch psychologischer Stress kann an der Entstehung und im Verlauf von RA mitwirken (58, 59).

Das Zusammenspiel von genetischen Risikofaktoren, prädisponierenden Umweltfaktoren und das Vorhandensein von autoreaktiven Antikörperspezies kann nach einer Phase der Toleranz den Übergang von der asymptomatischen in die symptomatische Phase der RA koordinieren.

Das charakteristische Merkmal von RA, die Zerstörung von Knorpel und Knochen in den periartikulären Gelenkregionen, wird durch hyperproliferierende Zellen der *Membrana synovialis* initiiert, die eine invasive Gewebsform ausbilden, den sogenannten Pannus. Die Synovialzellpopulation setzt sich hauptsächlich aus Fibroblasten-ähnlichen und Makrophagen-ähnlichen Synoviozyten zusammen. RA Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten (RASf) zeichnen sich durch einen invasiven Phänotyp mit reduzierter apoptotischer Aktivität aus, die durch Ausschüttung von Matrixmetalloproteinasen und Kathepsinen, sowie durch Expression pro-osteoklastogener Signale, den Gewebeuntergang von Knorpel und

periartikulärem Knochen induzieren (60). Lokale hypoxische Bedingungen wirken zusätzlich förderlich auf den invasiven Phänotyp der RASF (61). Makrophagen, sowie die daraus differenzierten Osteoklasten, gehören zu den wichtigen Schlüsselzellen der RA, auf die in Abschnitt 1.2.2. genauer eingegangen wird. Initiation und Persistenz von RA wird durch die komplexe Interaktion von Zellen des adaptiven Immunsystems, wie B- und T-Lymphozyten und antigen-präsentierenden dendritischen Zellen, mit lokalen, löslichen und zellulären Faktoren vermittelt (62-64). Wichtige humorale Mediatoren in RA sind Zytokine wie Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-23 und vor allem Tumor-Nekrosefaktor (TNF), die an der Regulation einer Vielzahl inflammatorischer Prozesse beteiligt sind (65). Als weiterer humoraler Faktor, neben den Zytokinen, spielt die Aktivierung des Komplementsystems eine große Rolle in der Pathogenese von RA (66).

Das konventionelle Therapie-Regimen für RA umfasst *First-Line* symptommildernde Medikamente wie nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente (NSAID) (z. B. Analgetika), sowie Immunsuppressiva (z.B. Glukokortikoide) (67, 68). Die Basistherapie erfolgt hauptsächlich mit DMARDs (*disease-modifying anti-rheumatic drugs*) wie Standard Methotrexat oder Sulfasalazin und Hydroxychloroquin (67, 68). Verstärkt hat sich in den letzten Jahren der Einsatz von sogenannten *Biologicals* als Ergänzung bzw. Alternative der Standard-Basistherapie. Biologicals können rekombinante Antikörper, rekombinante Rezeptoren oder Moleküle sein, die gegen zelluläre immunologische Strukturen gerichtet sind und deren Wirkung blockieren. Beispielsweise blockt Abatacept die T-Zell-Kostimulation, Etanercept und Infliximab blockieren TNF und Rituximab induziert die Depletion von B-Zellen (67).

Die unmittelbare Erforschung der humanen RA wird erschwert durch ethische Richtlinien, die schwierige Materialzugänglichkeit früher Erkrankungsstadien und die komplexe, multifaktorielle Ätiologie, die die gesamtheitliche Betrachtung des Zusammenspiels von Immun-, Nerven und endokrinem System mit den lokalen humoralen und zellulären Mediatoren erfordert. Aus diesem Grund wurde eine Vielzahl verschiedener Arthritis-Tiermodelle entwickelt, die in Verlauf und Symptomatik der Pathophysiologie der humanen RA ähneln. Neben der Analyse von komplexen Zusammenhängen, erlauben Tiermodelle die Analyse der spezifischen Beteiligung einzelner Moleküle (knock-out-Modelle) und Zelltypen sowie die Erprobung neuer Therapeutika. In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis genutzt, welches im folgenden Abschnitt genauer beschrieben wird.

1.1.1 Tiermodell: Kollagen Typ II-induzierte Arthritis

Experimentelle Arthritis-Studien werden größtenteils in Mäusen und Ratten durchgeführt, nur wenige andere Modelle sind bekannt, wie z.B. Studien in Kaninchen, Hunden und nicht-humanen Primaten (69). Für die Induktion von Arthritis in diversen Maus- und Rattenstämmen, kann eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen verwendet werden: Kollagen Typ II (CII)-induzierte Arthritis (CIA), Adjuvant-induzierte Arthritis, *Cartilage oligomeric matrix protein* (COMP)-induzierte Arthritis, Öl-induzierte Arthritis (Pristane, Squalen), Avridine-induzierte Arthritis sowie Streptokokkenzellwand-induzierte Arthritis (70). Zusätzlich wurden transgene Mausmodelle entwickelt, das bekannteste darunter ist das humane transgene TNF-Modell (Tg-huTNF). Weitere Modelle sind das KRN-Modell (transgener T-Zell-Rezeptor), das SKG-Modell (veränderte T-Zell-Rezeptorsignalweiterleitung) und Modelle, die Veränderungen in der Signalweiterleitung von IL-6 (gp130) und IL-1 aufweisen, sowie das KRN Serum-Transfermodell (70).

Bereits 1977 beschrieb die Gruppe um Trentham et al., dass die Applikation von endogenen und exogenen Kollagen II-Produkten, die Entstehung einer schweren Polyarthritits in Wistar und Sprague Dawley Ratten verursachte (71). Das Kollagen Typ II-induzierte Arthritis-Modell zeichnet sich dabei in Symptomatik und Mechanismen durch große Ähnlichkeit zur humanen RA aus. Analog zur humanen Erkrankung, weist der in dieser Arbeit verwendete Dark Agouti (DA) Rattenstamm eine genetische Suszeptibilität für Kollagen Typ II-induzierte Arthritis auf, die MHC- und nicht-MHC lokalisierte Gene umfasst (72, 73). Die Induktion von CIA erfolgt in DA Ratten und DBA/1-Mäusen durch eine einmalige intradermale Injektion von Kollagen Typ II, dem Hauptbestandteil von Gelenkknorpel, das in inkomplettem Freund Adjuvans (IFA) bzw. komplettem Freund Adjuvans (CFA) emulgiert wurde, während in C57BL/6-Mäusen drei Wochen nach der initialen Immunisierung mit Kollagen Typ II in CFA, eine zweite Immunisierung mit Kollagen in IFA erfolgt. Zwei Wochen nach Immunisierung beginnt in DA Ratten die symptomatische Phase der CIA, mit Schwellung und Rötung einzelner Zehen, die im Verlauf einer weiteren Woche zur maximalen Inflammation in allen Gelenken fortschreitet. DA Ratten weisen nach Immunisierung eine Inzidenz von nahezu 100% auf (74). Die Pathogenese von CIA umfasst, analog zur humanen Form, die Aktivierung humoraler und zellulärer Effektorfunktionen des Immunsystems. Die Initiation von CIA erfolgt über die Aktivierung von T-Zellen durch antigen-präsentierende Zellen (APC), die das modifizierte CII-Antigen präsentieren (75). Die Natur der APC in CIA ist nicht genau untersucht, aber neben den klassischen dendritischen Zellen wurden auch

Makrophagen und B-Zellen als APC identifiziert (75-77). Derart aktivierte T-Zellen stimulieren daraufhin autoreaktive B-Zellen zur Produktion von arthritogenen Antikörpern und die Kombination von T- und B-Zellaktivierung fördert so Initiation, Persistenz und Chronifizierung der anti-CII Immunreaktion (78, 79). Die Bedeutung von T- und B-Zellen in der Pathogenese von CIA konnte durch die Induktion von Arthritis in immundefizienten SCID (*severe combined immunodeficiency*)-Mäusen nach adoptivem Zelltransfer, sowohl von B- als auch T-Zellen aus CII-immunisierten Tieren, gezeigt werden (80, 81). In den letzten Jahren wurden eine spezielle T-Zell-Subpopulation und ein korrespondierendes Interleukin entdeckt, die neben RA bzw. CIA auch in anderen Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Die sogenannten Th₁₇-Zellen exprimieren IL-17, das neben seiner pro-inflammatorischen Wirkung auch starke katabole Effekte auf Knorpel und Knochen hat (82, 83). In der lokalen Entzündungsregion des Gelenks ist hauptsächlich das Zusammenspiel von aktivierten Synovialfibroblasten, Makrophagen, knochenabbauenden Osteoklasten und neutrophilen Granulozyten an der Degeneration von Knorpel- und Knochengewebe beteiligt (84-88). Im Gelenk von CIA-Mäusen wurden Kathepsin K und verschiedene Matrixmetalloproteinasen nachgewiesen, die für die proteolytische Matrix-Degradation verantwortlich sind (89, 90). Auf die Rolle von Osteoklasten wird in Abschnitt 1.2.2. näher eingegangen. Zu den Zytokinen, die wichtige pro-inflammatorische und regulatorische Funktionen in CIA einnehmen, zählen TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10, Interferon (IFN) γ und *transforming growth factor* (TGF)- β (91–96). IFN γ kann eine ambivalente Rolle in Kollagen-induzierter Arthritis ausüben, abhängig davon ob IFA oder CFA für die Arthritisinduktion verwendet wurde, sowie von dem untersuchten CIA-Zeitpunkt (97). Durch experimentelle Studien an Tieren, in denen spezifische Komponenten des Komplementsystems, wie z.B. die Komplementfaktoren C3 und C5 sowie Faktor B, ausgeschaltet wurden, wurde auch die Beteiligung des Komplementsystems als humoraler Faktor an der Pathogenese von CIA bestätigt (98, 99).

Gegenstand dieser Arbeit sind Untersuchungen zum Verhalten von Osteoklasten und deren Vorläuferzellen in verschiedenen Stadien der Arthritis. Das Tiermodell der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis ist dem schweren Verlauf der humanen RA sehr ähnlich, mit Pannusformation und fortschreitender Degradation von Knorpel und periartikulärem Knochen bis zur vollständigen Gelenkdestruktion unter Beteiligung von Makrophagen und Osteoklasten. Daher ist das CIA-Modell sehr gut geeignet um die hier gestellten Fragen zu beantworten.

1.2 Osteoklasten

Entgegen seiner starren äußeren Erscheinung, ist das Skelett ein hochgradig stoffwechselaktives Organ, das durch Interaktion mit dem endokrinen System, sowie Nerven- und Immunsystem, ständig an endogene und exogene Einflüsse angepasst wird um die Homöostase zu erhalten. Diese Anpassung erfolgt durch stringente Abstimmung der Aktivität der zwei wichtigsten Zelltypen des Knochens: den matrix-produzierenden Osteoblasten und den matrix-degradierenden Osteoklasten.

Osteoklasten sind ein einzigartiger, multinukleärer Zelltyp, der in der Lage ist die rigide Knochenmatrix abzubauen. Im dentalen Bereich werden Osteoklasten auch als Odontoklasten und bei der Knorpeldegradation im Verlauf der enchondralen Ossifikation, auch als Chondroklasten bezeichnet.

Bereits 1975 entdeckte D.G. Walker, dass Osteoklasten aus Vorläuferzellen der hämatopoetischen Stammzell (HSZ)-Linie gebildet werden (100). Durch verbesserte Methoden zur Analyse von intra- und extrazellulären Markern konnte eine Vorläuferpopulation identifiziert werden, die den Stammzellfaktor-Rezeptor c-Kit (CD117) exprimiert und zu Osteoklasten, aber auch Granulozyten, Makrophagen und Erythrozyten differenzieren konnte, aber keine Marker für T- und B-Lymphozyten exprimiert (101, 102). Die Studien von Arai und Kollegen lieferten den Beweis, dass Osteoklasten enddifferenzierte Zellen der Makrophagen-Monozyten-Zelllinie darstellen (c-Kit⁺, c-FMS⁺, Mac-1/CD11b^{dull}), die durch Fusion nach sequentieller Stimulation mit dem Wachstumsfaktor *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) und dem Osteoklastendifferenzierungsfaktor *receptor activator of nuclear factor κ B ligand* (RankL) entstehen (103). Auch im murinen Knochenmark wurde eine c-FMS⁺/CD11b^(-low)-Population identifiziert, die zu Osteoklasten ausdifferenzieren konnte (104). Abhängig vom lokalen Expressionsmuster von Zytokinen, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, können dendritische Zellen und auch Vorläuferzellen von B-Lymphozyten zu Osteoklasten transdifferenzieren (105-107). Die *in vitro*-Generation von Osteoklasten erforderte bis in die 1990er Jahre die Etablierung von Kokulturen aus Osteoblasten/Stromazellen mit Knochenmarkzellen. Die Identifizierung der essentiellen Moleküle M-CSF, der für das Überleben und die Proliferation von Makrophagen bzw. Osteoklastenvorläuferzellen notwendig ist (108, 109), und RankL, dem Osteoklastendifferenzierungsfaktor (110), ermöglichte die Etablierung reiner Osteoklastenkulturen aus Knochenmark-isolierten Makrophagen.

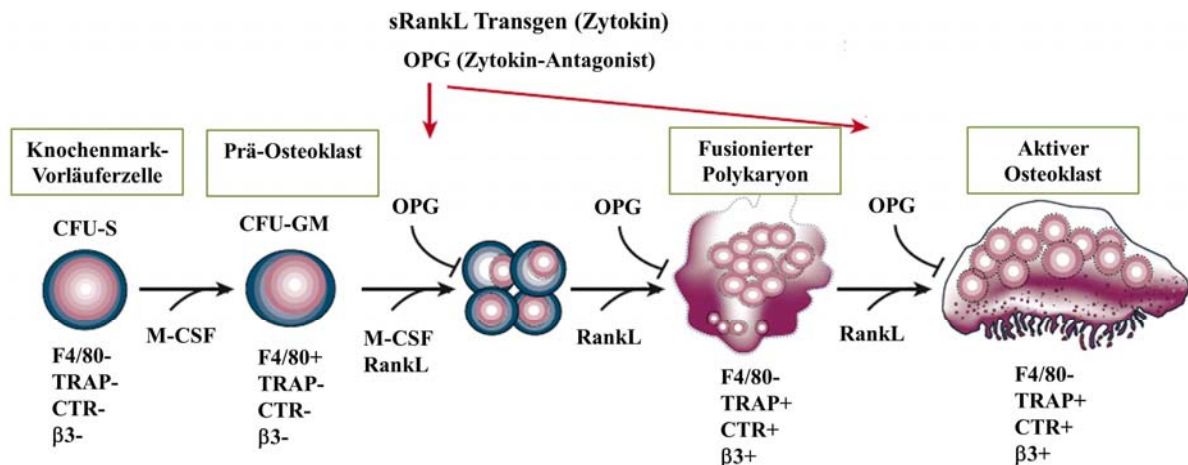


Abbildung 1-1: Osteoklastogenese.

Das Schema zeigt die Entwicklung von Osteoklasten aus multipotenten Knochenmarkszellen über Fusion spezifischer Osteoklasten-Vorläuferzellen durch sequentielle Stimulation mit *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) und *receptor activator of nuclear factor κB ligand* (RankL). Spezifische Marker für die verschiedenen Osteoklastenentwicklungsstadien umfassen F4/80, tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP), den Calcitoninrezeptor (CTR) sowie β₃-Integrin. Osteoprotegerin (OPG) hemmt die Osteoklastogenese auf unterschiedlichen Entwicklungsstufen. (modifiziert nach Boyle et al. (111))

Die verschiedenen Stadien der Osteoklastenentwicklung sind in **Abbildung 1-1** zusammengefasst. Einige Studien konnten zeigen, dass unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen, die Wirkung von M-CSF und RankL teilweise oder vollständig substituiert werden kann, was zu einer Entkopplung der strikt regulierten Osteoklastenentwicklung führt. So konnte durch Kombination von *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Flt3-Ligand, *placental growth factor* (PlGF) und *hepatocyte growth factor* (HGF), die eine Rolle in der Pathophysiologie des Knochen-Osteoklastoms spielen, die Wirkung von M-CSF ersetzt werden, (112). Die pro-inflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 haben eine pro-osteoklastogene Wirkung, können die Wirkung von RankL aber nicht vollständig übernehmen (113-115). Osteoblasten/ Stromazellen können über RankL-Expression die Osteoklastendifferenzierung positiv regulieren, verhindern aber gleichzeitig über Expression eines löslichen Rezeptors für RankL, Osteoprotegerin (OPG), eine überschießende Osteoklastenaktivierung (116). Verschiedene hormonelle und humorale Faktoren, sowie Zytokine sind als negative (anabole) und positive (katabole), direkte und indirekte Regulatoren der Osteoklastogenese bekannt. Katabole und kalzitrope Effekte wurden für 1,25 (OH)₂ Vitamin D₃, Prostaglandin E₂, IL-1, IL-6, TNF, Prolaktin, Glukokortikoide und Oncostatin M beschrieben (117-123). Anabole Effekte sind mit Molekülen wie Östrogen und Androgenen, Calcitonin, *platelet-derived growth factor* (PDGF) sowie Kalzium assoziiert (124-128). Parathormon und das verwandte Peptid PTHrP können

sowohl anabole als auch katabole Effekte auf die Knochenhomöostase ausüben, ebenso wie TGF- β (129-132).

Die Aktivierung des M-CSF-Rezeptorsignalwegs führt durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie c-FOS, *microphthalmia-induced transcription factor* (MITF) und PU.1, zur Expression des Rank-Rezeptors sowie zur Induktion früher Osteoklastenspezifischer Gene wie Kathepsin K, tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) und *nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1* (NFATc1) (133). Weiter werden über den Rank-Rezeptor mehrere Signalwege induziert, die zur Differenzierung von reifen Osteoklasten führen. Ein wichtiges Signalmolekül für die Weiterleitung des RankL-Stimulus ist *TNF receptor associated factor* (TRAF) 6, welcher die Transkriptionsfaktoren *nuclear factor of κ B* (NF κ B) und *activator protein* (AP)-1, die *mitogen-activated protein*-Kinasen (MAPK) und den Hauptregulator für die Osteoklastogenese, NFATc1, aktiviert. Durch Kooperation von NFATc1 mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie AP-1, PU.1, *cAMP response element-binding protein* (CREB) und MITF wird die Expression von Genen induziert, die für die Reifung von aktiv resorbierenden Osteoklasten notwendig sind. Dazu zählen beispielsweise das essentielle fusions-induzierende Protein *dendritic cell-specific transmembrane protein* (DC-STAMP), Atp6v0d2 (Untereinheit der Osteoklast-spezifischen Protonenpumpe), *osteoclast-associated receptor* (OSCAR), β_3 -Integrin, TRAP, Kathepsin K sowie der Calcitonin-Rezeptor (134). Die vollständige Aktivierung der Osteoklastendifferenzierung durch den Rank-Rezeptor benötigt ko-stimulatorische Signale über Rezeptoren, die ein *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM)-Motiv aufweisen, wie z.B. der Fc γ -Rezeptor oder DAP12 (135).

Aktive Resorption durch Osteoklasten ist *in vivo* nur durch direkten Kontakt mit Knochen möglich. **Abbildung 1-2** zeigt einen aktivierten Osteoklasten und die verschiedenen Bereiche der Zelle, die für die aktive Resorption von Bedeutung sind (136). Zur Initiation der Resorption wird der Osteoklast polarisiert und das Zytoskelett umarrangiert, so dass der sogenannte Aktinring entsteht. Dieser Aktinring bindet über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine fest an die Knochenoberfläche und schafft so einen zum Extrazellulärbereich versiegelten Raum zwischen Zelle und Knochenoberfläche, die sogenannte *sealing zone*. Innerhalb des Aktinrings bildet sich durch Fusion von Vesikeln mit der knochen zugewandten Membranseite, die sogenannte *ruffled border* (RB). Die fingerartigen Ausstülpungen der RB entstehen, wenn Vesikel mit der Zellmembran fusionieren und der Inhalt in die Resorptionslakune sezerniert wird. Der initiale Schritt der Knochendegradation besteht in der

Auflösung der kristallinen Hydroxyapatitstruktur durch Ansäuerung der Resorptionslakune. Dabei werden von speziellen Protonenpumpen H^+ -Ionen, die durch das Enzym Kohlendensäureanhydrase II gebildet werden, in das Resorptionskompartiment gepumpt und lösen das Hydroxyapatit aus der Matrix heraus. Im nächsten Schritt werden proteolytische Enzyme wie Matrixmetalloproteinase (MMP)-9 und vor allem Kathepsin K in die Lakune sezerniert, die dort den proteinogenen Anteil der Matrix, hauptsächlich Kollagen Typ I, abbauen. Intrazellulär werden die Abbauprodukte weiter degradiert unter Beteiligung von TRAP und durch Transzytose letztendlich über die sekretorische Domäne an der apikalen Zellmembran in den extrazellulären Bereich abgegeben.

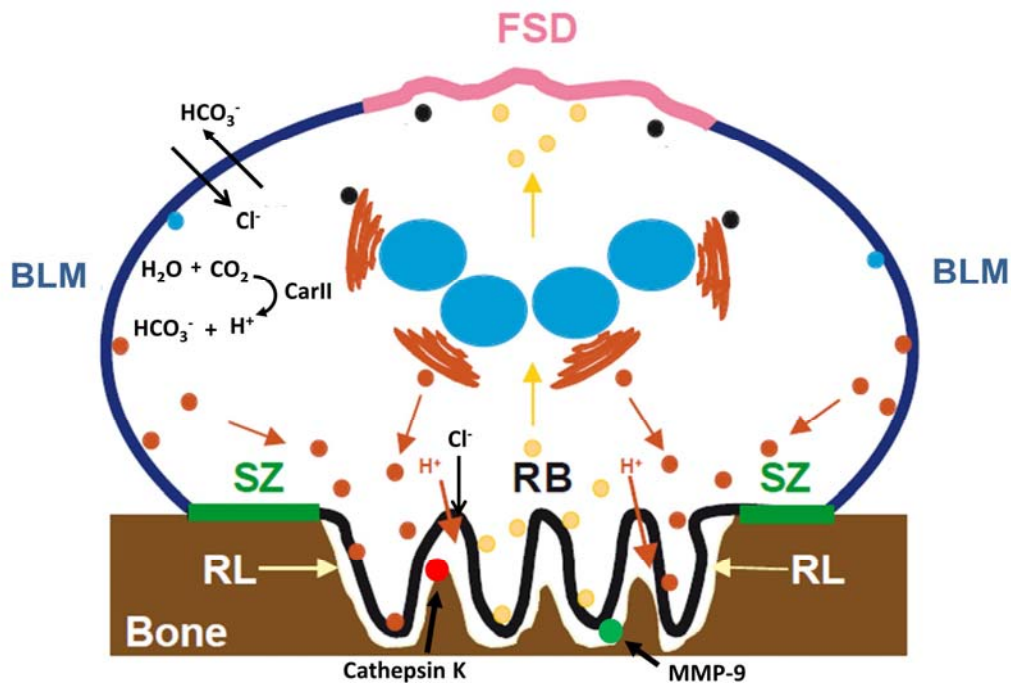


Abbildung 1-2: Knochenresorption durch einen aktivierten Osteoklasten.

1. An der knochenzugewandten Seite haften Osteoklasten über $\alpha v \beta 3$ -Integrine an der Matrix und bilden die *sealing zone* (SZ), die die Resorptionslakune (RL) hermetisch vom extrazellulären Umfeld abtrennt. Innerhalb der SZ entsteht die *ruffled border* (RB) durch konzentrierte Exo- und Endozytose, die Moleküle wie H^+ , Cl^- , Matrixmetalloproteinase (MMP)-9 und Kathepsin K in die Resorptionslakune transportiert und im Gegenzug Degradationsprodukte in die Zelle aufnimmt. **2.** H^+ , das durch Kohlendensäureanhydrase II aus CO_2 und H_2O gebildet wird, sowie Cl^- , lösen die kristalline Hydroxyapatit-Struktur des Knochens auf, dessen proteinogener Anteil im nächsten Schritt von Kathepsin K und MMP-9 abgebaut wird. **3.** Degradationsprodukte werden über Transzytose durch die Zelle transportiert und an der funktionalen sekretorischen Domäne (FSD) der apikalen Zellmembran in den extrazellulären Raum abgegeben.

BLM – basolaterale Membran; (modifiziert nach Väänänen et al (136)).

1.2.1 Osteoklasten-vermittelte Pathophysiologien

Eine defizitäre oder überaktive Osteoklastenfunktion ist für eine Vielzahl von Krankheitsbildern verantwortlich, denen genetische, hormonelle oder autoimmune Ursachen zugrunde liegen. In diesem Abschnitt soll auf einige der wichtigsten Krankheitsbilder eingegangen werden, mit dem Hauptaugenmerk auf der Rolle der Osteoklasten in RA.

Osteopetrose umfasst als Oberbegriff eine Vielzahl von Krankheiten, die mit einer fehlerhaften Osteoklastendifferenzierung oder -funktion assoziiert sind und ein sehr variables Krankheitsbild aufweisen. Osteopetrose wurde zuerst von Heinrich Albers-Schönberg als „Marmorknochenkrankheit beschrieben“ bei der eine gestörte Mikroarchitektur des Knochens mit verminderter mechanischer Stabilität auftritt. Osteopetrose führt zur Verdrängung des Knochenmarks und extramedullärer Blutbildung in Leber und Milz, Anämie, defekte Immunabwehr durch Panzytopenie und kann weiterhin pathologische Effekte in Organsystemen, wie dem Nerven- und dem Skelettsystem und dem Gastrointestinaltrakt verursachen. Weitere osteopetrose-bedingte Abnormitäten findet man im oropharyngealen sowie im dentalen Bereich. Humangenetische Untersuchungen haben bisher Mutationen in RankL, β 3-Integrin, Untereinheiten der H^+ -ATPase (TCIRG1, ATP6B1), einem Chloridtransporter (CLCN7), Kathepsin K (CTSK, Pyknodysostose), der E3 Ubiquitin-Ligase (OSTM1), Kohlendensäureanhydrase II (CAII), einem Vesikel-gebundenen Protein (PLEKHM1), sowie für *NF κ B essential modulator* (NEMO, einem Vermittler des NF κ B-Signalweges) als Ursache für Osteopetrose identifiziert. Mutationen des Rank-Rezeptors, sowie weiterer Osteoklasten-bezogener Gene wurden im Maus- und in geringerem Umfang im Rattenmodell gefunden. Bisher gibt es keine effektive Therapie für Osteopetrose, nur in schweren Fällen werden hämatopoietische Stammzellen transplantiert (137).

Morbus Paget (Paget-Syndrom, Osteodystrophia deformans) ist eine Erkrankung des Skeletts, die erhöhte Osteoklastenaktivität und abnorme Knochenbildung beinhaltet und zu Knochenverformung und -fraktur, sowie Verdickung des Schädelknochens, Knochenschmerz und sekundärer Osteoarthritis führen kann. Paget-Osteoklasten sind zahlreicher als normal und zeigen eine spezielle Morphologie mit einer erhöhten Anzahl von Nuklei pro Osteoklast und erhöhter Resorptionsaktivität. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Paget-Osteoklasten sensibler auf pro-osteoklastogene Faktoren wie 1,25-(OH) $_2$ Vitamin D $_3$, RankL und TNF reagieren und vermehrt IL-6 produzieren, das als Verursacher für viele der beobachteten Abnormitäten gilt. Die Ätiologie von Morbus Paget ist komplex und bisher nicht ausreichend

erforscht. Sicher ist, dass genetische und autoinflammatorische Komponenten, sowie Umweltfaktoren (u.a. Virusinfektionen) beteiligt sind (138). Therapieansätze umfassen chirurgische Korrekturen, Krankengymnastik, Schmerztherapie mit nicht-steroidalen Antirheumatika sowie hauptsächlich Anti-Resorptionstherapien mit Bisphosphonaten, die die Resorptionsaktivität von Osteoklasten hemmen und die Apoptose-Aktivität erhöhen, in seltenen Fällen außerdem die Anwendung von Calcitonin (139). Erweiterte Therapiestrategien umfassen die Inhibition von RankL mit einem künstlichen Analogon von Osteoprotegerin (Denosumab), was aber nur eine reversible Inhibition der Osteoklastenaktivität zur Folge hat und so eine dauerhafte Anwendung von Denosumab erfordert (140).

Eine weitere Osteoklasten-assoziierte Erkrankung ist die **Osteoporose**, die durch Abnahme der Knochendichte durch erhöhte Osteoklastenaktivität und eine erhöhte Anfälligkeit für Frakturen gekennzeichnet ist. Unterteilt wird die Osteoporose in primäre und sekundäre Osteoporose, wobei die erste Form weiter in idiopathische juvenile, postmenopausale (Typ I) und Altersosteoporose (Typ II) unterteilt wird. Zu den Verursachern für sekundäre Osteoporose werden hormonelle (außer Östrogen, z.B. Hypogonadismus, Hyperkortisolismus), gastroenterologische, medikamentöse (Langzeit-Kortisol, Heparin, Vitamin-K-Antagonisten) und erbliche Ursachen, die nicht Osteoklasten-vermittelt sind (Osteogenesis imperfecta) ebenso wie neoplastische Erkrankungen (Multiples Myelom, Mastocytose) und Entzündungen (Morbus Crohn und auch RA) gezählt (141, 142). Bei der postmenopausalen Osteoporose entfällt durch einen Mangel an Östrogen die hemmende Wirkung auf Osteoklasten und das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau verschiebt sich in Richtung Resorption, wie ovariectomie-induzierte osteoporotische Tiermodelle zeigen (143). Neben diätischen Therapien, wie eine Kalzium- und Vitamin D-reiche Ernährung, werden bei Osteoporose anti-resorptive Therapien angewendet. Diese umfassen Hormonersatztherapien und Hormonrezeptormodulatoren, Bisphosphonate und Calcitonin, PTH, Strontiumranelat und Denosumab, der artifizielle Rank-Rezeptor. Neueste Therapeutika sind Kathepsin K-Inhibitoren (Odanacatib) sowie Anti-Sclerostin-Antikörper (144).

1.2.2 Pathomechanismen der Osteoklastenaktivierung in RA

In der Pathophysiologie der RA spielen Osteoklasten eine maßgebliche Rolle. Zum einen sind sie Mediatoren der lokalen Knochenerosion und zum anderen führen systemische Komponenten zur Entwicklung eines allgemeinen osteoporotischen Phänotyps. Radiologische Messungen von Gewebsstrukturschäden spielen in der Dokumentation des Krankheitsverlaufs

eine große Rolle, da schwere strukturelle Schäden eine schlechte Prognose bedeuten (145). Daher hat die Entwicklung von Therapien, die eine Verlangsamung oder einen Stillstand der periartikulären Knochendestruktion und die Induktion von Reparaturmechanismen (bisher unerreicht) vermitteln können, eine große Bedeutung.

Einige der identifizierten ACPA binden citrulliniertes Vimentin und können so an Osteoklasten-Vorläuferzellen, die dieses Protein exprimieren, binden und dadurch die Synthese von TNF induzieren, welches in einer autokrinen Schleife die Differenzierung zu Osteoklasten induziert (145, 146). So kann schon sehr früh das Auftreten struktureller Schäden induziert werden. Nach Initiation der Entzündungsreaktion werden im lokalen Gelenk-Mikromilieu der RA eine große Anzahl von Faktoren exprimiert, die die Entstehung und Aktivierung von Osteoklasten vervielfachen und regulatorische Mechanismen aussetzen. Zum einen werden im Gelenk Faktoren wie u.a. M-CSF exprimiert, das aktivierte Makrophagen in das Gelenk einwandern lässt, wo diese reifen und weiter pro-inflammatorische und pro-osteoklastogene Faktoren wie TNF produzieren (147). Zum anderen sammelt sich dadurch eine große Menge potentieller Osteoklastenvorläuferzellen in der Gelenkregion an (148). In der entzündlichen Arthritis wird, neben der Expression durch Knochenzellen, RankL vor allem von T-Lymphozyten und Synovialfibroblasten exprimiert (149). TNF (150), *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) (151) sowie IL-17 (152) sind nur einige der pro-osteoklastogenen Faktoren, deren erhöhte Konzentration in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten gefunden wurde. Die Kombination hoher Expressionsraten pro-osteoklastogener Moleküle und einer großen Anzahl von Vorläuferzellen induzieren eine negative Spirale von Osteoklasten-Neubildung und Knochenabbau, die letztendlich zum Funktionsverlust des Gelenks führen kann. Vor allem TNF-vermittelte Effekte wirken sich potenzierend auf katabole Osteoklasteneffekte aus. In **Abbildung 1-3** sind die verschiedenen Phasen der Knochenerosion im Verlauf der RA dargestellt. Pro-osteoklastogene Effekte durch TNF können entweder indirekt durch RankL-Induktion oder direkt über den TNF-Rezeptor 1 auf Osteoklasten vermittelt werden (153, 154). Systemisches TNF beeinflusst das *Trafficking* von Osteoklasten-Vorläuferzellen, die sich in der Milz sammeln und anschließend in die Entzündungsregion einwandern (155). Im transgenen TNF-überexprimierenden Mausmodell wurde eindrucksvoll nachgewiesen, dass erhöhte TNF-Konzentration zu systemischer Osteoporose und massiven Knochenerosion führt (156, 157).

Die meisten der unter 1.1. beschriebenen DMARDs, sowie Biologicals bewirken neben der anti-inflammatorischen Wirkung auch eine Remission der strukturellen Schädigungen, die durch überschießende Osteoklastenaktivität verursacht wird (145).

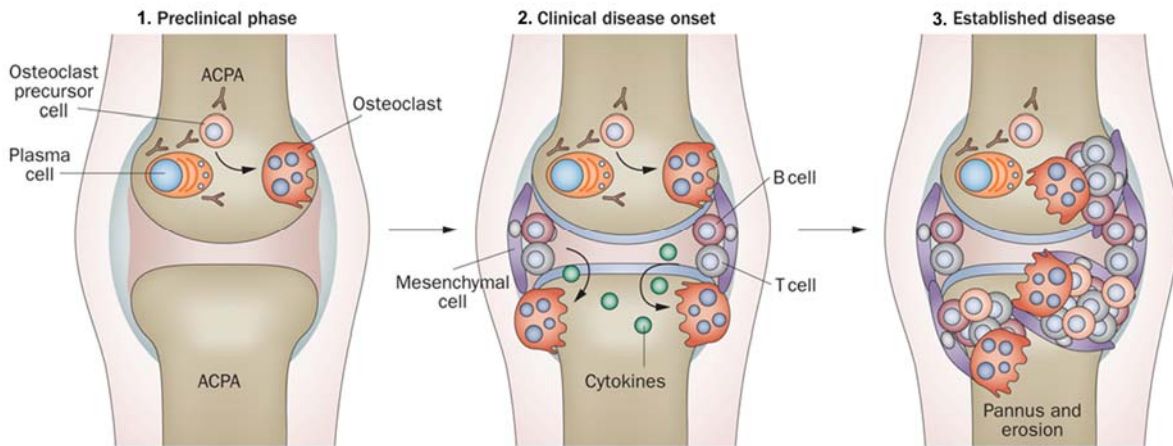


Abbildung 1-3: Progression der Knochenerosion in RA.

1. In der präklinischen Phase der RA produzieren autoreaktive B-Lymphozyten ACPA, die an Strukturen auf Osteoklasten binden können. Die ACPA-Bindung initiiert Mechanismen, die die Osteoklastogenese induzieren. **2.** Die einsetzende Synovitis und die daraus resultierende Zytokinproduktion, führen zur Expression von RankL und zur Differenzierung von Osteoklasten, die eine verstärkte Knochenerosion in den periartikulären Bereichen verursachen. **3.** Die späte Phase ist durch große Erosionsflächen gefüllt mit entzündetem, synovialem Pannusgewebe charakterisiert. (modifiziert nach Schett & Gravalles (145))

ACPA – anti-citrullinated peptide antibody, RA – Rheumatoide Arthritis, RankL – *receptor activator of nuclear factor κ B ligand*

1.3 Das periphere sympathische Nervensystem

Neben den zellulären und humoralen Faktoren des Immunsystems spielen in der RA auch Effektoren eines weiteren regulatorischen Supersystems eine Rolle – das Nervensystem (NS). Die bidirektionale Kommunikation von Nerven- und Immunzellen über ihre jeweiligen spezifischen Mediatoren wurde hinreichend bewiesen (158). In diesem Abschnitt soll der Einfluss des vegetativen (autonomen) NS im Skelettsystem, sowie die Kommunikation verschiedener Neurotransmitter mit Knochenzellen, näher erläutert werden.

Das Nervensystem setzt sich zusammen aus dem autonomen Nervensystem und dem somatischen Nervensystem, die in ihrer Gesamtheit wiederum anatomisch getrennt werden können in das zentrale und das periphere Nervensystem. In dieser Arbeit sollen hauptsächlich Einflüsse des peripheren Nervensystems im Vordergrund stehen. Das autonome Nervensystem wird weiterhin unterteilt in das parasympathische Nervensystem (PNS) und das sympathische Nervensystem (SNS), deren Funktionen antagonistisch oder ergänzend auf Drüsen, Blut- und Lymphgefäße, Skelettmuskulatur, Fettgewebe u.v.m. wirken können (159,

160). Zentrale Impulse werden nicht direkt an die Zielorgane übermittelt, sondern über vegetative Zentren des Rückenmarks synaptisch auf präganglionäre Fasern übertragen. Die präganglionären Fasern des PNS entspringen den kranio-sakralen Zentren, von wo sie in die Nähe der Erfolgsorgane ziehen oder diese direkt innervieren. Die prä- und postganglionäre Signalübertragung erfolgt in parasymphatischen Nervenfasern durch den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh). Präganglionäre Fasern des sympathischen Nervensystems aus dem Rückenmark enden an den Grenzstrangganglien oder an den Hals- und Bauchstrangganglien, wo sie auf postganglionäre Fasern umgeschaltet werden oder sie ziehen weiter zu terminalen Ganglien. Neurotransmitter der präganglionären sympathischen Synapse ist ACh, an der postganglionären Synapse dagegen erfolgt die Signalübermittlung durch Noradrenalin (NA). Einzige Ausnahme ist die Innervierung der Schweißdrüsen, die cholinerg stimuliert wird. Eine Besonderheit stellt das Nebennierenmark dar, das nach cholinergischer Stimulation durch präganglionäre Fasern, Adrenalin und in geringerem Umfang Noradrenalin in die Blutbahn freisetzt und so eine humorale Komponente des SNS darstellt (160). Neben den „klassischen“ Neurotransmittern ACh und NA existieren eine Vielzahl von Ko-Transmittern wie verschiedene Neuropeptide z. B. Neuropeptid Y (NPY), vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Substanz P (SP), Enkephalin oder Somatostatin, sowie Adenosintriphosphat (ATP), Stickstoffmonoxid (NO) oder Lipidmediatoren in sympathischen und parasymphatischen Nervenfasern (159, 160). ACh und VIP sind häufig ko-lokalisiert in parasymphatischen Fasern von Blutgefäßen (in getrennten Vesikeln) bzw. in exokrinen und Schweißdrüsen (160). In den nächsten Abschnitten sollen die peripheren Funktionen der klassischen Neurotransmitter ACh und NA, sowie des Neuropeptides VIP kurz genauer charakterisiert werden, da diese für einen Großteil der experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation verwendet wurden.

1.3.1 Noradrenalin

Das Katecholamin Noradrenalin (NA) ist ein biogenes Amin, das enzymatisch aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert wird. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Synthese ist dabei die Umsetzung von Tyrosin zu L-Dopa durch das Enzym Tyrosin-Hydroxylase (TH), dessen immunhistologischer Nachweis gleichzeitig als Nachweis für adrenerge Nervenfasern dient (161). Die Erhöhung des Sympathikus-Tonus durch exogene oder endogene Stimuli / Stressoren führt zur Ausschüttung von NA und Adrenalin. Diese binden an entsprechende Rezeptoren auf ihren Zielorganen, wie Herz, Leber, Fettgewebe,

glatte Muskulatur oder Blutgefäße und induzieren dort Prozesse, die eine Anpassung an den Stimulus ermöglichen. NA, aber vor allem Adrenalin sind klassische Vermittler der adaptiven Stressantwort, oder „*Fight-or-Flight*“-Reaktion (162). Für Noradrenalin existieren zwei Rezeptorsubklassen: die hochaffinen α 1- und α 2-Adrenozeptoren (AR), die auf sehr geringe Konzentrationen Noradrenalin ansprechen, und die niedrig-affinen β -Adrenozeptoren, die nur durch hohe Konzentrationen aktiviert werden. Jeder dieser Rezeptorsubtypen kommt in drei verschiedenen Varianten vor und sie gehören alle zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. **Tabelle 1-1** gibt einen Überblick über die AR-Subtypen, die Art der jeweiligen G-Protein-Kopplung und den nachgeschalteten Signalweg. Einige Gewebe, wie der Herzmuskel und das Fettgewebe, zeigen eine sehr charakteristische Expression von β 1- bzw. β 3-Adrenozeptoren. Viele andere Gewebe exprimieren aber eine Vielzahl verschiedener AR in unterschiedlicher Quantität, deren Aktivierung eine Vielzahl von antagonistischen und synergistischen Effekten in der Zelle auslösen kann (162). Die Komplexität dieser Prozesse ist bis heute Gegenstand zahlreicher Studien und ermöglicht eine sehr genaue Feinabstimmung der Stressantwort.

Einleitung

Rezeptorsubtyp	G-Proteinfamilie	Intrazelluläre Signalübertragung
Noradrenalin (Adrenozeptoren)		
Alpha _{1A/1B/1D} ⁽¹⁶³⁾	G _{q/11}	Phospholipase C → Diacylglycerol / Inositol-1,4,5-triphosphat (IP ₃)
	G _i oder G _o	Phospholipase A ₂ → Arachidonsäure
Alpha _{2A/2B/2C} ⁽¹⁶³⁾	G _i	inhibiert Adenylatzyklase → cAMP ↓
Beta _{1/2/3} ⁽¹⁶⁴⁾	G _s	aktiviert Adenylatzyklase → cAMP ↑ cAMP stimuliert Proteinkinase A1/A2
Beta ₂ ^(164, 165)	G _i	inhibiert Adenylatzyklase → cAMP ↓
Beta ₂ ⁽¹⁶⁴⁾	G-protein unabhängig	β-Arrestin 1/2 → MAP-Kinase
Acetylcholin		
<u>Nikotinerg</u>	G-protein	Kalziumionen (Ca ²⁺), <i>voltage-dependent calcium channels</i> (VDCC), kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung
Ionenkanal (α und β Untereinheiten) ⁽¹⁶⁶⁾	unabhängig	
<u>Muskarinerg</u>		
M1/M3/M5 ⁽¹⁶⁷⁾	G _{q/11}	Phospholipase C → Diacylglycerol / IP ₃
M2/M4 ⁽¹⁶⁸⁾	G _i oder G _s	inhibiert Adenylatzyklase → cAMP ↓ oder aktiviert Adenylatzyklase → cAMP ↑
VIP		
VIP-Rezeptor 1 und 2 ⁽¹⁶⁹⁾	G _s	aktiviert Adenylatzyklase → cAMP ↑ Phospholipase C → Diacylglycerol / IP ₃ oder Phospholipase D
PACAP-Rezeptor 1 ⁽¹⁶⁹⁾	G _s	aktiviert Adenylatzyklase → cAMP ↑ Phospholipase C → Diacylglycerol / IP ₃

Tabelle 1-1: Übersicht über Rezeptoren für Noradrenalin, Acetylcholin und VIP und die Signalweiterleitung in der Zelle über spezifische G-Proteine und ihre nachgeschalteten Signalwege. cAMP – zyklisches Adenosinmonophosphat, IP₃ – Inositol-1,4,5-Triphosphat, PACAP – *pituitary adenylate cyclase-activating peptide*, VIP – vasoaktives intestinales Peptid

Noradrenalin ist ein wichtiger Neuromodulator des Immunsystems und unzählige Studien zeigen die Beteiligung von NA an der Regulation immunologischer Prozesse. Umgekehrt können auch inflammatorische Mediatoren die Ausschüttung von NA regulieren (161). Hier soll nur ein kurzer Überblick über die verschiedenen Funktionen von NA in immunologischen Prozessen gegeben werden. Noradrenerge Effekte in der RA werden in Abschnitt 1.3.4. mit erläutert.

Der noradrenerge Einfluss auf verschiedene Effektorfunktionen des Immunsystems wird hauptsächlich durch den β 2-Adrenozeptor vermittelt, der von fast allen Zellen des Immunsystems in unterschiedlicher Quantität exprimiert wird, ausgenommen Th2-Lymphozyten (161, 164). Weiterhin wurden der α 1- und α 2-Adrenozeptor auf hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und allen Entwicklungsstufen der Monozyten/Makrophagen-Linie nachgewiesen (170). Eine Aktivierung des SNS beeinflusst die Migration und die Zirkulation von Lymphozyten - vorrangig NK-Zellen - und Granulozyten und inhibiert die Proliferation von T-Lymphozyten (161). Außerdem wirkt das aktivierte SNS, abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu, modulierend auf die T- und B-Zellantwort (171) und auf antigen-präsentierende dendritische Zellen (172) und reguliert die Chemokinexpression durch Immunzellen (161). Weitere Effekte von NA umfassen die Hemmung der NK-Zell- und Neutrophilen-Aktivität (173, 174), während der Einfluss auf Zellen der Monozyten-Makrophagen-Linie ambivalenter Natur ist mit gleichzeitig aktivierenden und inhibierenden Mechanismen, möglicherweise definiert durch die jeweilige Expressionsstärke von α - und β 2-AR zu den beobachteten Zeitpunkten (161). Verschiedene Einflüsse, die einer Antwort durch das Immunsystem zur Wiederherstellung der Homöostase bedürfen, wie z. B. Infektionen, unterschiedlichste Arten von Traumata, Sepsis und autoimmune Erkrankungen, verlangen eine entsprechend adaptierte Immunantwort. Diese wird durch die Diversität der noradrenergen Regulationsmechanismen in immunkompetenten Zellen ermöglicht. Der Einfluss von Noradrenalin in Autoimmunerkrankungen wie der RA sind äußerst komplex und der Stand der aktuellen Forschung wird in Abschnitt 1.3.4. erläutert.

1.3.2 Acetylcholin

Otto Loewi entdeckte 1920 als erster, dass eine chemische Substanz die Reizweiterleitung am Nervus vagus von Froschherzen vermittelte. Diese Substanz wurde wenig später von Henry Dale als Acetylcholin (ACh) identifiziert (175). Zwei Entdeckungen, die 1936 mit dem Nobelpreis für Physiologie / Medizin honoriert wurden. ACh wird durch Übertragung einer Acetylgruppe von Acetyl-Coenzym A auf Cholin gebildet, katalysiert durch das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT), dem Markerenzym für cholinerge Nervenfasern. Der Abbau von ACh erfolgt enzymatisch durch Acetylcholinesterase (162). ACh überträgt die Nervenreize an der neuromuskulären Endplatte, bewirkt die Umschaltung aller präganglionären Signale auf postganglionäre Nerven, ist der Haupt-Neurotransmitter des

parasympathischen Nervensystems und damit Gegenspieler von Noradrenalin, und übermittelt ebenfalls Signale an einigen sympathischen postganglionären Nervenendigungen (Schweißdrüsen) (160). ACh vermittelt seine Wirkung über zwei verschiedene Rezeptortypen; den nikotinergen Rezeptor (nAChR) und den muskarinergen Rezeptor (mAChR). Der nAChR wird durch Nikotin stimuliert und ist ein pentamerer Ionenkanal, der sich aus α - und β -Untereinheiten zusammensetzt. Die muskarinergen Rezeptoren werden durch Muskarin stimuliert und gehören zu den metabotropen G-gekoppelten Rezeptoren (162). Je nach Zusammensetzung der Untereinheiten werden nikotinerge Rezeptoren in Rezeptoren des Muskeltyps und des neuronalen Typs unterschieden (160). Aus neun verschiedenen α -Subtypen und bisher drei entdeckten β -Subtypen, können homomere (nur α) oder heteromere (α und β) Rezeptoren gebildet werden, die sich in ihrer Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen unterscheiden. Deren Aktivierung durch ACh kann drei verschiedene zytoplasmatische Signalwege induzieren. Zum einen kann der direkte Kalziumeinstrom nach Rezeptoraktivierung Effekte vermitteln, zum anderen können nach Depolarisation der Membran durch Aktivierung des nAChR, *voltage-dependent calcium channels* (VDCC) aktiviert werden und es kann zur Kalzium-induzierten Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum kommen (166). Kalzium ist als universelles intrazelluläres Signal an der Regulation von Prozessen wie Erregungsweiterleitung, Exozytose, Motilität, Apoptose sowie Transkription involviert (176). Die fünf muskarinergen ACh-Rezeptoren können weiterhin in zwei Gruppen unterteilt werden: in M1/M3/M5, deren Effekte über G_q -gekoppelte Rezeptoren (167) vermittelt werden und in M2/M4, die G_i - oder G_s -gekoppelte Rezeptoren (168) darstellen. In **Tabelle 1-1** findet sich die jeweilige assoziierte Signalweiterleitung in der Zelle.

Neben dem neuronalen cholinergen System existiert auch ein nicht-neuronales cholinerges System, dass für die Regulation vieler lokaler, parakrin und autokrin vermittelter, physiologischer Reaktionen zuständig ist und phylogenetisch sehr viel älter ist als das neuronale System. Die Expression von ACh selbst, oder von Enzymen, die an der ACh-Synthese und -Transport beteiligt sind, wurde schon in verschiedenen Bakterienstämmen, Algen, Protozoen oder einfachen Pflanzen gezeigt (177). Im Menschen wurde die Beteiligung des nicht-neuronalen cholinergen Systems an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in der Haut, im respiratorischen, kardiovaskulären und muskuloskelettalen System, im Verdauungssystem sowie im Urogenitaltrakt und im Reproduktionssystem nachgewiesen (178). Im Immunsystem konnte die Produktion von ACh in T-Zellen, dendritischen Zellen,

Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen gezeigt werden und es wurden nikotinerge und muskarinerge Rezeptoren auf Immunzellen detektiert, deren Expression individuell stark verschieden ist und deren Ansprechen durch ACh gegensätzliche Reaktionen bewirken kann (178, 179). Je nach muskarinerem Rezeptortyp, wurde eine Verstärkung der Immunantwort durch Induktion der Differenzierung von T-Lymphozyten und durch reduzierte Produktion von IgG1 und IL-6 in M1 und M5 knock out-Mäusen, assoziiert (180, 181). Großes Interesse wurde dem nAChR zuteil, der aus der $\alpha 7$ Untereinheit besteht, da dieser vor allem mit anti-inflammatorischen Mechanismen assoziiert wird. In Makrophagen, die den $\alpha 7$ nACh-Rezeptor exprimieren, inhibiert dieser sogenannte cholinerge anti-inflammatorische Reflex die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF und bietet daher therapeutisches Potential bei der Behandlung von Erkrankungen, die mit hohen Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine verbunden sind (182). Auf die Beteiligung des neuronalen und nicht-neuronalen cholinergen Systems an der Pathophysiologie der RA wird in Abschnitt 1.3.4. genauer eingegangen.

1.3.3 Vasoaktives intestinales Peptid

Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) ist ein aus 28 Aminosäuren bestehendes Neuropeptid, das aus einem 170 Aminosäuren-Vorläufermolekül entsteht und zuerst als potenter Vasodilator aus dem Dünndarm von Schweinen isoliert wurde (169, 183). VIP gehört zu einer Familie strukturverwandter Proteine, zu der auch *pituitary adenylate cyclase-activating peptide* (PACAP), Sekretin, Glukagon, *glucagon-like peptide 1* und 2, *glucose-dependent insulinotropic polypeptide* und *growth-hormone releasing factor* gehören (169). VIP-Effekte können über drei verschiedene Rezeptoren übermittelt werden, VIP-Rezeptor 1 und 2 bzw. PACAP-Rezeptor 1, die alle zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zählen. VIP bindet mit sehr hoher Affinität an VIP-Rezeptor 1 und 2 und mit einer sehr niedrigen Affinität an PACAP Rezeptor 1. Die Rezeptoren koppeln alle an G_s -Proteine, die zur Aktivierung von Adenylatzyklase und zur Erhöhung der cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)-Konzentration im Zytosol führen. In einigen Zellen führt die Rezeptoraktivierung von VIP-Rezeptor 1 und 2 zusätzlich zur Aktivierung von Phospholipase C oder D, während PACAP-Rezeptor 1 immer an Phospholipase C gekoppelt ist (zusammengefasst in **Tabelle 1-1**) (169). Intrazelluläre Signalwege beinhalten die Aktivierung von MAP-Kinasen, Tyrosinkinasen, die Transaktivierung von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Kalziumkanäle, RhoA GTPasen und Src (169).

VIP ist der wichtigste Vertreter des peptidergen autonomen / parasympathischen Nervensystems. Eine starke Innervierung mit VIP-positiven Nervenfasern wurde in einer Vielzahl peripherer Organe gefunden, wie z.B. in Speichel- und Schilddrüse, in Ösophagus und Magen, Dünndarm und Kolon, Pankreas sowie im respiratorischen und im Urogenitaltrakt, wo es hauptsächlich die Entspannung der glatten Muskulatur, Vasodilatation und Erhöhung der Urinsekretion bewirkt (183). VIP beeinflusst auch die Produktion von Insulin und Glukagon in den Langerhans-Inselzellen des Pankreas (184) und ist ebenfalls an der Regulation des kardiovaskulären Systems beteiligt (185).

VIP-Immunoreaktivität wurde auch in verschiedenen lymphatischen Organen wie dem Thymus, Knochenmark und Milz, Lymphknoten und dem „Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebe“ nachgewiesen (186). Neben der Existenz von neuronalem VIP stellen auch Immunzellen selbst eine Quelle für das Neuropeptid dar und ermöglichen damit autokrin und parakrin vermittelte lokale dezentralisierte Effekte. Die Hauptproduzenten von VIP (mRNA und Protein) sind $CD4^+$ Th2-Lymphozyten und $CD8^+$ T2-Lymphozyten. Interessanterweise wurde in Neutrophilen und Mastzellen die Produktion von VIP-Fragmenten mit antimikrobiellen Eigenschaften nachgewiesen (187). Da eine Vielzahl von Immunzellen Rezeptoren für VIP exprimieren, kann das Neuropeptid als Modulator der Immunantwort angesehen werden. VIP-Rezeptor 1 wird konstitutiv von einer Vielzahl von Immunzellen exprimiert, inklusive Lymphozyten (Thymozyten, $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Lymphozyten), Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen, Mikroglia und Mastzellen. Eine geringe Expression von VIP-Rezeptor 2 findet man eher auf naiven und ruhenden Zellen, die nach Stimulation die Expression des Rezeptors erhöhen, sowie auf Makrophagen/Monozyten nach Aktivierung von Toll-like Rezeptor (TLR) 2 oder 4. PACAP-Rezeptor 1 wurde bisher auf Zellen der Makrophagen-Monozyten-Linie nachgewiesen (187). Eine niedrige Expression des VIP-Rezeptors 1 auf Lymphozyten wurde mit autoimmunen Erkrankungen wie Spondylitis ankylosans, RA und Osteoarthritis korreliert (187). Dies und weitere Effekte von VIP in RA werden in Abschnitt 1.3.4. näher erläutert. In der Signalweiterleitung in Makrophagen und Monozyten wurde zusätzlich zu den oben beschriebenen Signalwegen die Inhibition der nukleären Translokation von NF κ B beschrieben (187). Die immun-modulatorischen Effekte von VIP auf Zellen des angeborenen Immunsystems umfassen die Inhibition pro-inflammatorischer Mediatoren wie TNF, IL-6, IL-12 und Cyclooxygenase (COX)-2, sowie die Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und die Produktion von IL-10 in aktivierten Makrophagen, dendritischen Zellen und

Mikroglia und die Herunterregulation von *high mobility group-box 1* (HMBG1) in Makrophagen. VIP inhibiert die Expression pro-inflammatorischer Chemokine, verhindert die Expression von TLR und induziert die Expression toleranz-induzierender dendritischer Zellen (187). VIP-Einflüsse auf das adaptive Immunsystem umfassen eine Inhibition der T-Zell-Aktivierung durch Inhibition der Expression kostimulatorischer Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen und die Inhibition der Expression von IL-12. VIP-Effekte können die Verschiebung der Th1/Th2-Balance in Richtung Th2-Antwort verursachen und durch direkte und indirekte Mechanismen regulatorische T-Zellen induzieren (187).

Effekte der Neurotransmitter NA und ACh sowie des Neuropeptids VIP können nicht getrennt voneinander betrachtet werden. Allein die Expression einer Kombination von Rezeptoren für NA, ACh und VIP impliziert die Generation einer integrativen Antwort aus synergistischen oder antagonistischen Effektormechanismen, abhängig von Quantität und Qualität der jeweiligen Rezeptorantwort. Außerdem können $\alpha 2$ -Adrenozeptoren die Acetylcholinfreisetzung cholinergischer Nerven regulieren (188) und cholinerge Transmission kann durch adrenerg-vermittelte Reize beeinflusst werden (189). Auch durch eine mögliche Ko-Lokalisation von ACh und VIP, wie sie u. a. für einen kleinen Prozentsatz der zerebralen Nervenfasern von Katzen beobachtet wurde, können die vermittelten Effekte nicht unabhängig voneinander betrachtet werden (190). Zusätzlich können ACh und VIP die Expression von Tyrosin-Hydroxylase induzieren und damit die Synthese von Katecholaminen steigern (191). *In vitro*-Studien zu Neurotransmittereffekten, wie in der vorliegenden Dissertation, ermöglichen daher eine klare Analyse der isolierten Effekte der jeweiligen Neurotransmitter.

1.3.4 Die sympathische Innervierung von Knochen und Gelenken und pathophysiologische Mechanismen in der rheumatoiden Arthritis

In dieser Dissertation soll das Hauptaugenmerk auf den knochenabbauenden Zellen, den Osteoklasten, sowie auf ihren Vorläuferzellen der Makrophagen-Monozyten-Zelllinie liegen. Daher wird in diesem Abschnitt die physiologische Innervierung des Knochens kurz erläutert und dann der mögliche neuronale Einfluss auf Osteoklasten herausgestellt.

Das Knochengewebe ist dicht durch sympathische Nervenfasern innerviert und impliziert dadurch neuronale Impulse als Regulatoren der Knochenhomöostase. TH-positive katecholaminerge Nervenfasern im Knochen und Knochenmark sind zumeist mit Blutgefäßen

kolokalisiert, aber in Periost und in den knochennahen Regionen der Ligamente finden sich auch freie Nervenendigungen, die Signale an Knochenzellen weiterleiten können (192, 193). Cholinerg-parasympathische Nervenfasern, in denen die Expression des vesikulären Acetylcholin-Transporter (VAChT) nachgewiesen wurde, wurden beispielsweise im trabekulären Knochen der distalen Femurmetaphyse gefunden (194), sowie in verschiedenen Kompartimenten der Tibia (195). Zusätzlich sind Osteoblasten in der Lage nicht-neuronale ACh-Effekte zu übermitteln, da sie ein intrazelluläres Repertoire an Enzymen besitzen, dass für die Synthese von ACh benötigt wird (178). Interessanterweise ist die Innervierung des Sternum-Periosts vorwiegend cholinergischer Natur. Asmus und Kollegen konnten aber nachweisen, dass initial sympathische Nervenfasern das Sternum-Periost innerviert haben, die durch lokale periostale Faktoren zu einem Switch in ihrem Phänotyp zu cholinerg / peptiderger Expression veranlasst wurden (196). Analog konnten auch prä-Osteoblasten, MC3T3-E1-Zellen, die Transition von katecholaminerger zu cholinerg / peptiderger Innervierung induzieren (197). Lokale Knochen- und Periost-assoziierte Faktoren können demnach den Phänotyp katecholaminerger Nervenfasern zu cholinerg / peptiderger Innervierung induzieren und so das lokale Neurotransmittermilieu beeinflussen. Ob und welche Effekte dies in inflammatorischen Konditionen wie der rheumatoiden Arthritis hat, bedarf weiterer Studien. VIP-immunoreaktive Nervenfasern formen zahlreiche Verästelungen in der Nähe epiphysärer trabekulärer Knochen und im Periost und sind auch im Knochenmark lokalisiert (195, 198).

Der Einfluss neuronaler Signale auf den Knochenmetabolismus wurde durch eine Vielzahl von Studien bestätigt. In diesen Studien wurde durch Stimulation oder Deletion die Reizweiterleitung moduliert oder der Knochenphänotyp von Rezeptor-knock out-Mäusen untersucht (199-202). Ergebnisse von *in vivo*-Studien sind durch die enge Kopplung von Knochenaufbau und -abbau sehr schwierig zu interpretieren, da die Effekte auf Osteoklasten und Osteoblasten nicht unmittelbar voneinander zu trennen sind. Zellen des Knochengewebes exprimieren eine Vielzahl verschiedener Neurotransmitterrezeptoren, durch die ihre metabolische Aktivität moduliert werden kann (203). Osteoklasten exprimieren sowohl α - als auch β -Adrenozeptoren, wobei β -AR aktivierend auf die Osteoklastenaktivität wirken, während die Wirkung des α -AR bisher ungeklärt ist (204, 205). Auch Rezeptoren für VIP, genauer VIP-Rezeptor 1 und der alternative VIP-Rezeptor, PACAP-Rezeptor 1, wurden auf isolierten Osteoklasten nachgewiesen (206). In *in vitro*-Kokulturmodellen von Osteoklasten und Osteoblasten führt VIP zu einer reversiblen Hemmung der Resorptionsaktivität, wobei

sich der Effekt bei verlängerter Stimulationsdauer umkehrt und eine Induktion der Resorption bewirkt (207). Es gibt bisher nur vereinzelte Studien zum Einfluss von ACh auf Osteoklasten oder zur Expression cholinergerezeptoren auf Osteoklasten. Tanaka et al. konnten zeigen, dass Stimulation mit Nikotin die Expression von Osteoklastenmarkergenen wie MMP-9 und Kathepsin K inhibierte und die planare Fläche der Zellen reduzierte, ohne einen Effekt auf die Resorption auszuüben. Parallel beobachteten die Autoren die Expression verschiedener α -nikotinerger Untereinheiten, inklusive $\alpha 7$, in einer induzierbaren murinen Osteoklastenzelllinie (RAW264.7) (208). Diese Beobachtungen zeigen deutlich, dass eine direkte Modulation der Osteoklastenaktivität durch die Stimulation mit NA, ACh oder VIP möglich ist.

Pathophysiologische Mechanismen der RA umfassen auch Veränderungen in der lokalen synovialen Innervierung oder Modulation des Krankheitsverlaufs durch neuronale Stimulation. Für das SNS wurden bisher ambivalente Effekte beschrieben. Durch Sympathektomie konnte in einigen Arthritis-Tiermodellen der Krankheitsverlauf positiv beeinflusst werden, während in Tieren mit einem erhöhten sympathischen Tonus schwerere Arthritisverläufe festgestellt wurden (209). Härle et al. konnten 2005 nachweisen, dass der Zeitpunkt der Sympathektomie den Verlauf bestimmt, mit schwereren Verläufen nach Sympathektomie in frühen Arthritisphasen und positivem Einfluss in späteren Phasen (210). Parallel wurde der Verlust von sympathischen Nervenfasern im entzündeten Synovialgewebe und das Auftreten katecholaminerger, TH-positiver Zellen beobachtet, was zu einer Veränderung der lokalen Neurotransmitterzusammensetzung führen kann (211, 212). Katecholaminerge TH-positive Zellen haben einen anti-inflammatorischen Effekt in experimenteller Arthritis (213). **Abbildung 1-4** vermittelt einen Überblick über den Einfluss von lokalen NA-Konzentrationsgefällen zu verschiedenen Arthritiszeitpunkten (209). In frühen Phasen wird die T- und B-Zellaktivierung durch das SNS propagiert, die $\beta 2$ -AR-vermittelte inhibierende Effekte auf Makrophagen überlagern. Nach einer Übergangsphase, in der die TH-positiven katecholaminergeren Zellen auftauchen, bewirkt $\beta 2$ -AR Stimulation die Inhibition pro-inflammatorischer, IL-7-Rezeptor exprimierender B-Zellen sowie von Zellen des angeborenen Immunsystems und induziert die Produktion von anti-inflammatorischem IL-10 in B-Zellen (209).

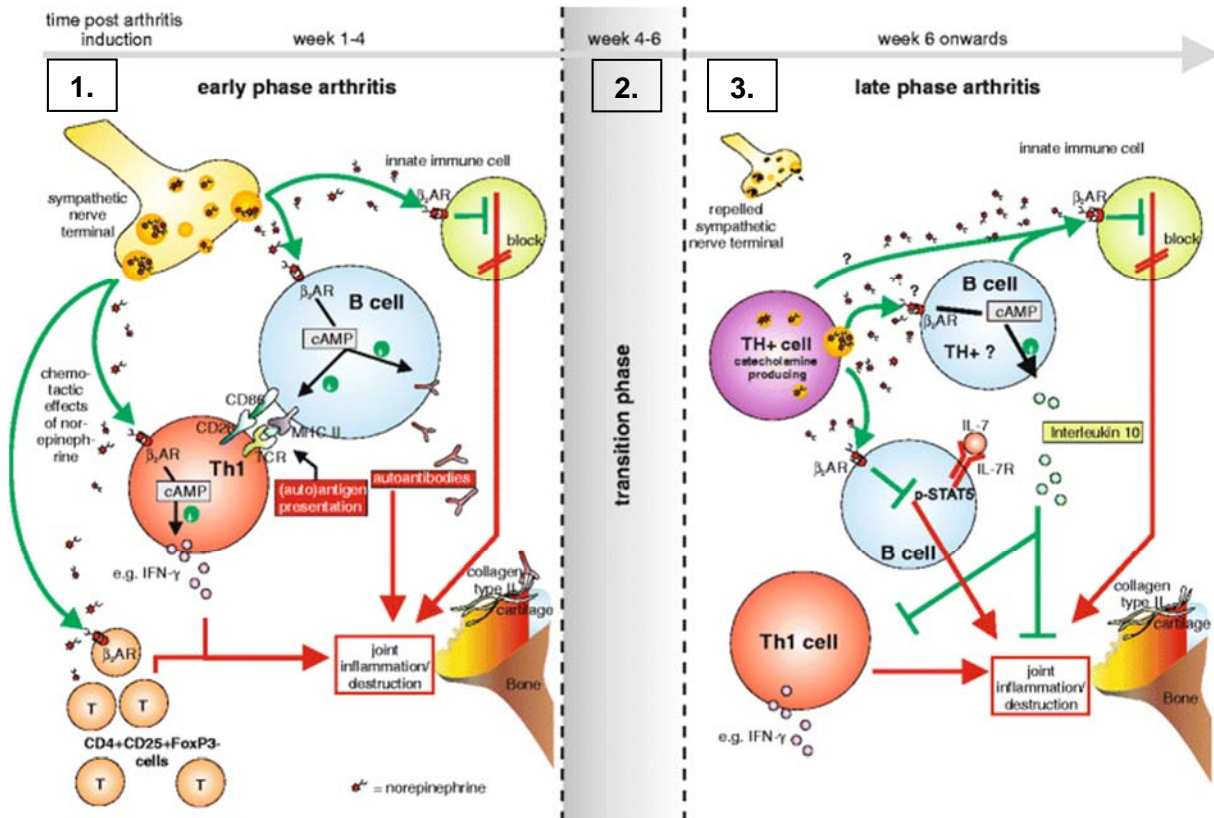


Abbildung 1-4: Modellsystem zur Einflussnahme des sympathischen Nervensystems in Arthritis.

1. In der frühen Arthritisphase überlagern pro-inflammatorische Effekte des sympathischen Nervensystems (SNS), wie Stimulation von T- und B-Lymphozyten, die anti-inflammatorischen Effekte, wie die Inhibition von Makrophagen über den β_2 -Adrenozeptor und fördern so die Progression der Arthritis. **2.** In einer Übergangsphase verändert sich der pro-inflammatorische Einfluss zu einem anti-inflammatorischen Einfluss, der durch die lokale Produktion von Katecholaminen durch Tyrosin-Hydroxylase (TH)-positive Zellen gesteuert wird. **3.** Die hohen lokalen NA-Konzentrationen inhibieren über den β_2 -Adrenozeptor, pro-inflammatorische, IL-7-Rezeptor-positive B-Zellen sowie Zellen des angeborenen Immunsystems und induzieren IL-10 produzierende, anti-inflammatorische B-Zellen. AR: Adrenozeptor, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, CD: Cluster of Differentiation, FoxP3: forkhead box P3, IFN: Interferon, MHC: major histocompatibility complex, pSTAT5: phosphorylated-signal transducer and activator of transcription 5, TCR: T-Zell-Rezeptor, TH1: T1-Helferzelle (modifiziert von (209))

In den letzten Jahren ist das cholinerge System als wichtiger Effektor in RA immer weiter in den Vordergrund gerückt. Zum einen wurde im Synovialgewebe und auf Fibroblasten-ähnlichen Zellen von RA-Patienten der α_7 nAChR gefunden (214) und zum anderen konnte die Applikation von Nikotin den Verlauf der experimentellen Arthritis positiv beeinflussen, abhängig von Zeitpunkt, Art der Applikation und vom Immunstatus (215-217). Anti-inflammatorische Effekte von Acetylcholin wurden bisher vor allem mit dem α_7 nAChR, über den sogenannten cholinergen anti-inflammatorischen Reflex assoziiert (**Abbildung 1-5**) (182), obwohl experimentelle Arthritis-Studien in α_7 nAChR-knock out-Mäusen eher

kontroverse Ergebnisse erbracht haben, die diese Hypothese nicht überzeugend unterstützen (218, 219).

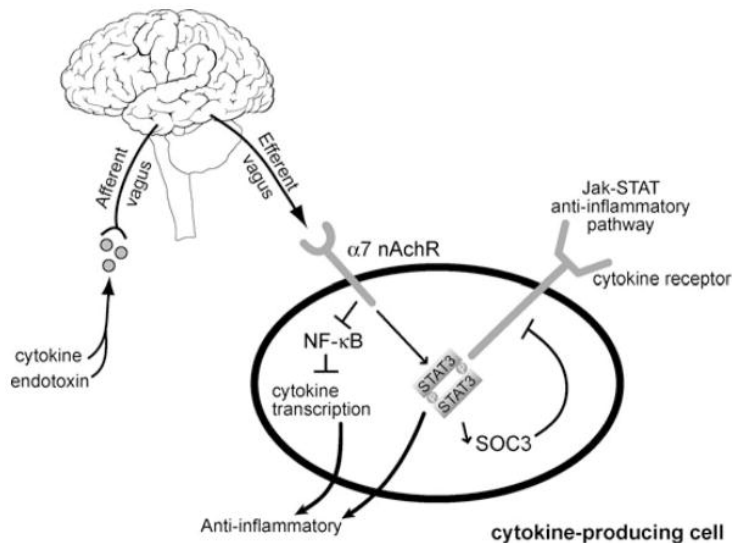


Abbildung 1-5: Der cholinerge anti-inflammatorische Reflex.

Die Aktivierung des Vagus-Nervs bewirkt die Freisetzung von Acetylcholin (ACh), das über Bindung an den nikotinergen $\alpha 7$ ACh-Rezeptor, auf aktivierten Makrophagen und anderen Zytokin-produzierenden Zellen, die nukleäre Translokation von NF κ B und damit die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie z. B. TNF inhibiert.

(übernommen von (220))

Neuere Studien zeigen hingegen, dass chronisch entzündliche Erkrankungen wie RA auch die Induktion eines nicht-neuronalen cholinergen Systems im synovialen Gewebe, vor allem in Regionen mit hohem Anteil Fibroblasten- und Makrophagen-ähnlicher Synoviozyten induziert. Diese Art von Gewebe ist unter physiologischen Bedingungen nicht durch cholinerge Innervierung gekennzeichnet (221). Neben $\alpha 7$ nAChR wurden auch muskarinerge ACh-Rezeptoren entdeckt, die als Vermittler von nozizeptiven Reizen und als vasoregulatorische Mediatoren in der experimentellen Arthritis beschrieben wurden (222, 223). Da Immunzellen über verschiedene ACh-Rezeptoren differentiell reguliert werden können, wie in Abschnitt 1.3.2. erklärt, dient die weitere Erforschung des cholinergen Systems der Offenlegung von mechanistischen Wegen, die mit inflammatorischen Erkrankungen wie RA assoziiert sind. Dem lokalen nicht-neuronalen cholinergen System kommt daher in der RA eine große Bedeutung zu, da es entweder ergänzend zum neuronal vermittelten cholinergen Reflex wirken kann, oder gar vollkommen für die beobachteten anti-inflammatorischen Effekte in experimenteller Arthritis verantwortlich ist. Es bedarf weiterer Studien um genaue Mechanismen zu identifizieren.

Das Neuropeptid VIP wird als versatiler anti-inflammatorischer und spezifischer anti-arthritogener Mediator beschrieben. Applikation von VIP im Mausmodell von Kollagen Typ II-induzierter Arthritis reduzierte die Inzidenz, verzögerte das Auftreten der Symptome,

reduzierte den Schweregrad und die Zerstörung des Gelenks (224). Delgado et al. haben umfangreiche Studien zu VIP-Effekten in experimenteller Arthritis veröffentlicht (224).

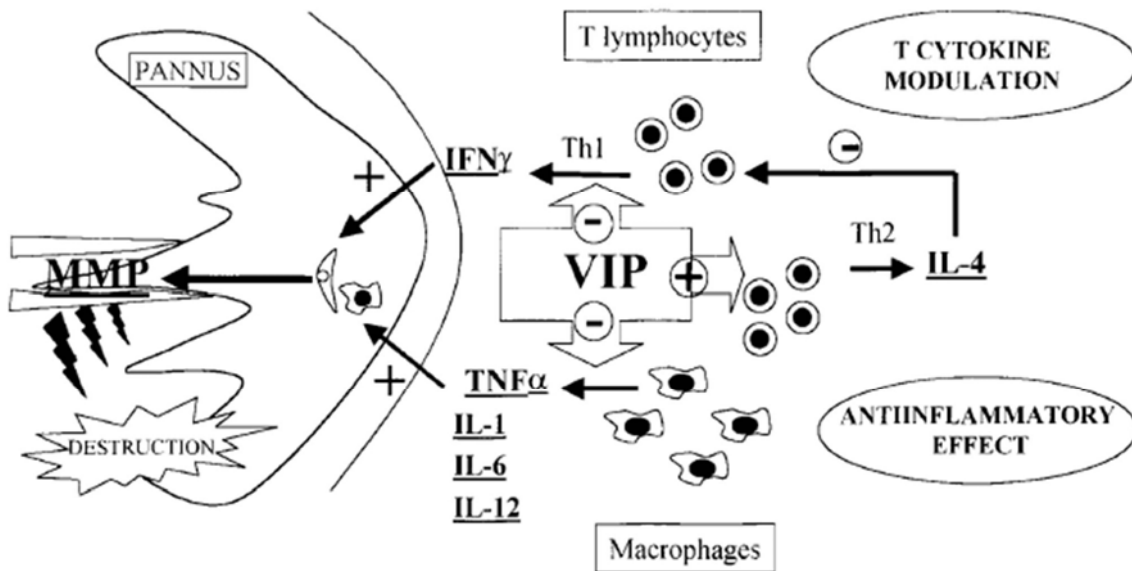


Abbildung 1-6: Schematische Darstellung des Einflusses von VIP auf Entzündungsprozesse in RA.

VIP verhindert Entzündungsprozesse durch Einflussnahme auf Komponenten des angeborenen und des adaptiven Immunsystems. VIP inhibiert Th1-Zell-vermittelte Effekte und reduziert die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen. Parallel induziert VIP die Differenzierung von Th2-Zellen, die anti-inflammatorisches IL-4 produzieren.

IFN: Interferon, IL: Interleukin, Th: T-Helferzelle, TNF: Tumornekrosefaktor, VIP: vasoaktives intestinales Peptid (übernommen von (224))

Abbildung 1-6 stellt schematisch den Einfluss von VIP in rheumatoider bzw. experimenteller Arthritis dar. So umfassen allgemeine Effekte von VIP die Reduktion der Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-1 β , IL-6 und pro-inflammatorischer Chemokine wie *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1, *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 α und β sowie die Induktion anti-inflammatorischer Mediatoren wie IL-10 und IL-1Ra (löslicher IL-1 Rezeptor). VIP-Applikation in CIA reduzierte die Titer der autoreaktiven Antikörper gegen Kollagen Typ II und induzierte einen Shift in der T Helfer-Zellantwort von Th1 zu Th2. Zusätzlich wurde die Expression von MMPs gehemmt, die an der Zerstörung von Knochen und Knorpel beteiligt sind. Hauptzielzellen der VIP-Effekte sind dabei Fibroblasten- und Makrophagen-ähnliche Synoviozyten des Pannusgewebes. Während der Induktion der Arthritis ist die Konzentration von endogenem VIP in Serum und Gelenken von Mäusen stark erhöht, aber der exponentielle Anstieg pro-inflammatorischer Mediatoren überlagert diese Effekte. Exogene Applikation von VIP stellt daher eine therapeutische Option dar, erfordert

aber die Einbeziehung möglicher Nebeneffekte, die den Gastrointestinaltrakt beeinflussen sowie die Möglichkeit der Induktion einer generellen Immunsuppression.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass sich während der Entwicklung von RA ein anti-inflammatorisches cholinerges /peptiderges Transmittermilieu im synovialen Gewebe ausbildet, das initial von Katecholaminen antagonisiert und in späteren Phasen synergistisch unterstützt wird.

2 Ziel der Arbeit

Makrophagen und Osteoklasten haben eine Schlüsselposition in den pathophysiologischen Mechanismen der rheumatoiden Arthritis inne. Zum einen produzieren Makrophagen große Mengen an TNF, dem wichtigsten pro-inflammatorischen Zytokin in der RA, und zum anderen sind Makrophagen Vorläuferzellen von Osteoklasten, deren übermäßige Aktivierung in der RA zur progressiven Gelenkzerstörung beiträgt. Außerdem werden in der Entzündungsregion zelluläre Faktoren exprimiert, die durch Inhibition von Apoptose und Verstärkung der Proliferation u.a. in Makrophagen, die Persistenz der Entzündung propagieren. Neben immunologischen Mediatoren wurden auch Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems in einer Vielzahl von *in vivo*-Studien als Modulatoren der Arthritis identifiziert. Für katecholaminerge Nervenfasern wurden Arthritis-induzierte Veränderungen in der lokalen synovialen Innervierung beobachtet, sowie das dezentralisierte Auftauchen von katecholaminergen, TH-positiven Zellen in der Synovialmembran, die ein lokal verändertes NA-Mikromilieu erzeugen. Lokal von Knochen- und Periostzellen exprimierte Faktoren sind in der Lage, eine Veränderung des katecholaminergen Phänotyps von Nervenfasern in einen cholinergen / peptidergen (VIP) Phänotyp zu induzieren und somit eine neue regulatorische Neurotransmitterumgebung zu schaffen.

In dieser Arbeit soll charakterisiert werden, ob durch die verschiedenen Krankheitsstadien von Kollagen Typ II-induzierter Arthritis (CIA) in Dark Agouti-Ratten metabolische Eigenschaften von Knochenmark-Makrophagen (KMM) sowie deren Kapazität zur Osteoklastogenese beeinflusst werden. Weiterhin soll untersucht werden, wie die sympathischen Neurotransmitter ACh, NA und VIP an der Induktion und Persistenz der Veränderung beteiligt sind.

Dabei sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Wie beeinflussen die verschiedenen CIA-Stadien metabolische Eigenschaften von Knochenmark-isolierten Makrophagen wie Apoptose, Adhäsion und Proliferation?
2. Welchen Einfluss haben ACh, NA und VIP auf diese Parameter im Kontext von CIA?
3. Wird in den verschiedenen CIA-Stadien die Osteoklastogenesekapazität von KMM beeinflusst?
4. Wie beeinflussen ACh, NA und VIP die Osteoklastogenese von KMM im Kontext der verschiedenen CIA-Stadien?

Ziel der Arbeit

Der *in vitro*-Ansatz der vorliegenden Doktorarbeit ermöglichte die Analyse der gestellten Fragen ohne den Einfluss von undefinierten lokalen und systemischen Gelenksfaktoren. Das Ziel der Arbeit ist, den Einfluss verschiedener CIA-Stadien in Zusammenhang mit sympathischer Neurotransmitterstimulation auf den Makrophagenmetabolismus des Knochenmarks zu charakterisieren. Die vorliegende Arbeit wurde als Teilprojekt des Schwerpunktprogramms SPP 1468 „Immunobone“ (GR 1301/10-1) durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert.

3 Material und Methoden

3.1 Tierexperimentelle Arbeiten

3.1.1 Versuchstiere

Für diese Arbeit wurden 10 Wochen alte weibliche Dark Agouti (DA)-Ratten der Firma Janvier (Le Genest St. Isle, Frankreich), mit einem Gewicht von 150-170g verwendet. Die Unterbringung erfolgte in den Tierlaboratorien der Universität Regensburg. Circa eine Woche vor Versuchsbeginn wurden die Tiere zur Eingewöhnung in Gruppen von 4 oder 6 Tieren in einem Standardkäfig unter Standard-Laborbedingungen (Temperatur $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, Luftfeuchtigkeit 50-60%, Licht-Dunkel-Zyklus 12:12 Stunden) untergebracht. Die Experimente wurden gemäß der Richtlinien für tierexperimentelle Forschung von der Regierung der Oberpfalz genehmigt (Az. 54-2532.1-25/13).

3.1.2 Kollagen Typ II Arthritis Modell

Gelöstes bovines Kollagen Typ II (#804001-sol, MD Bioproducts, Egg, Schweiz) und inkomplettes Freund Adjuvans (IFA, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurden mittels eines Homogenisators im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Herstellung und die Aufbewahrung der Emulsion bis zur Verwendung erfolgten auf Eis, um eine Denaturierung des Kollagens zu verhindern (225). Vor der Injektion wurden die Tiere sediert. Dazu wurde zuerst eine Kurzbetäubung mittels des volatilen Narkotikums Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) vorgenommen. Den so betäubten Tieren wurde anschließend ein antagonisierbarer Narkosecocktail bestehend aus Medetomidin (Domitor, Orion Pharma Animal Health, Turku, Finnland), Midazolam (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) und Fentanyl (Rotexmedica, Trittau, Deutschland) intramuskulär (i.m.) injiziert (Tag 0). Zur Auslösung der experimentellen Arthritis wurde den DA-Ratten 300µl des Homogenats (entspricht 300µg Kollagen Typ II) ca. 1cm unterhalb der Schwanzwurzel intradermal appliziert. Anschließend wurde die Narkose mit einem Aufwachcocktail aus Atipamezol (Antisedan, Orion Pharma Animal Health, Turku, Finnland), Flumazenil (Hexal, Holzkirchen, Deutschland) und Naloxon (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) antagonisiert. Die Aufwachphase der Tiere wurde kontrolliert. Den Kontrolltieren wurde statt Kollagen Typ II 300µl einer sterilen 0,9%igen Kochsalz (NaCl)-Lösung (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) appliziert.

In den hier dargestellten Experimenten soll der Einfluss von verschiedenen Arthritis-Stadien auf die Osteoklastogenese der Knochenmark-Makrophagen untersucht werden. Der erste Zeitpunkt wurde mit 10 Tagen nach Immunisierung festgelegt. Zu diesem Zeitpunkt sind noch keine äußerlichen Symptome der Arthritis zu erkennen, aber Studien haben gezeigt, dass immunologische und endokrine Systeme stark aktiviert sind. Erste äußerliche Symptome zeigen sich 15 Tage nach Immunisierung mit Schwellungen einzelner Zehen. Nach 20 Tagen ist das frühe akute Arthritisstadium erreicht, mit maximaler Entzündung in den Gelenken aller vier Extremitäten. Das chronische Stadium wird nach etwa 40 Tagen erreicht und ist gekennzeichnet durch den Rückgang der äußerlichen Entzündungsmerkmale während gleichzeitig der maximale Umbau des Gelenkgewebes mit ausgedehnter Fibrosierung erreicht ist.

3.1.3 Klinischer Bewertungsmaßstab der experimentellen Arthritis

Um den Verlauf der experimentellen Arthritis zu dokumentieren wurden die immunisierten Tiere zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten (10, 15, 20 und 40 Tage nach Immunisierung) durch ein Punktesystem bewertet (modifiziert nach (210)). Für das Auftreten von Entzündungsanzeichen wie Schwellung und Rötung an einem oder mehreren Zehen einer jeweiligen Extremität wurde ein Punkt vergeben. War die Entzündung bis zum Mittelfuß ausgeweitet wurden 2 Punkte vergeben, bei entzündeten Gelenken bis zum Knöchel gab es drei Punkte. War das Tier in seiner Bewegungsfähigkeit stark beeinträchtigt, so wurde für die betroffene Extremität ein zusätzlicher Punkt vergeben. Bei den vorderen Gliedmaßen wurden nur die Zehen und der Mittelhandbereich beurteilt. In einigen Fällen konnte an den hinteren Extremitäten keine Schwellung oder Rötung festgestellt werden, aber das betreffende Tier konnte das Bein nicht mehr bewegen und die Hüfte schien der Hauptort der Entzündung zu sein, in diesem Fall wurde ebenfalls mit vier Punkten bewertet. Pro hinterer Extremität konnten also maximal vier Punkte und pro vorderer Extremität maximal zwei Punkte vergeben werden, Höchstpunktzahl pro Tier 12 Punkte.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Isolation und Kultivierung von Knochenmark-Makrophagen

Die Ratten wurden 10, 15, 20 und 40 Tage nach Immunisierung aus dem Experiment entnommen und mittels CO₂ getötet. Femur und Tibia wurden aseptisch entfernt und das

Knochenmark nach einem modifizierten Protokoll von Ahmed et al. (226) isoliert. Femur und Tibia wurden aus dem Kniegelenk disloziert und die Condylen mit einer 18G-Kanüle (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) geöffnet. Hüftkopf und Sprunggelenk wurden mittels Schere abgetrennt und die Knochen in der Mitte zerteilt, wobei auf möglichst glatte Enden geachtet wurde. Die Knochen wurden mit den nach oben zeigenden gelenknahen Bereichen in ein 1,5ml Eppendorf-Röhrchen überführt und 5 Minuten (Min.) bei 5.000xg zentrifugiert um das Knochenmark aus dem Knochen zu lösen. Die Zellen des erhaltenen Knochenmarks wurden über ein 40µm-Zellsieb vereinzelt und erneut pelletiert (245xg, 5 Min.). Durch hypotonen Schock in eiskaltem sterilem Aqua bidest (A.dest), wurden die enthaltenen Erythrozyten lysiert. Mit 10x PBS wurde die Lösung auf 1x PBS eingestellt und zentrifugiert. Das vormals rote Pellet war nach der Behandlung weiß-gelblich und wurde in Makrophagen-Medium aufgenommen (20ml/Tier). Knochenmark-Makrophagen (KMM) können durch ihre Fähigkeit zur Adhärenz an unbehandelte Plastikoberflächen aus Gesamtknochenmark separiert werden (227). Je 5ml der Zellsuspension wurden in eine 100x20mm-Petrischale (#430591, Corning, Amsterdam, Niederlande) ausgesät. Nach zwei Tagen Vorkultur bei 37°C und 5% CO₂ wurden die adhärennten Makrophagen durch 0,02% EDTA/PBS und 5 Min. Inkubation auf Eis, gefolgt von 1 Min. bei -20°C, sowie mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Nach der Zentrifugation (245xg, 5 Min.) wurden die Zellen in αMEM aufgenommen und die Zellzahl mittels Cedex-Zellzählgerät (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) bestimmt. Die Zellsuspension wurde auf 1x10⁶ Zellen /ml eingestellt und die Zellen mit einer Dichte von 1,5x10⁴ Zellen/cm² für die entsprechenden Experimente ausgesät.

Makrophagen-Medium

Minimal Essential Medium, αModifikation

10% fötales Kälberserum (FKS)

2% Glutamat

1% Antibiotikum/Antimykotikum	alle	Sigma-Aldrich,	Taufkirchen, Deutschland
-------------------------------	------	----------------	-----------------------------

20ng/ml rekombinantes M-CSF (Ratte)	#400-28,	Peprtech,	Rocky Hill, NJ, USA
-------------------------------------	----------	-----------	---------------------

3.2.2 *In vitro*-Osteoklastogenese

Um die Differenzierung von KMM zu Osteoklasten zu induzieren, wurden die Zellen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen/cm² aus einer Suspension von 1×10^6 Zellen/ml ausgesät. Um ein Anheften der KMM an der Wand der Zellkulturschale zu verhindern, wurde das geringe Volumen mit der entsprechenden Zellmenge in die Mitte der Vertiefung pipettiert und nach 5-10 Min. mit Osteoklasten-Medium aufgefüllt. M-CSF dient als Wachstums- und Überlebensfaktor für die KMM, während RankL der hauptsächliche Osteoklastendifferenzierungsfaktor ist. Um den besten Endzeitpunkt für die Differenzierung herauszufinden, wurde die Differenzierung nach 3, 4 und 5 Tagen durch Fixierung der Zellen gestoppt und nach TRAP-Färbung (3.5.1.) die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Zellen mit mindestens drei Zellkernen wurden als Osteoklasten gewertet. Für alle weiteren Experimente wurde ein Differenzierungszeitraum von 5 Tagen gewählt.

Osteoklasten-Medium

Minimal Essential Medium, α Modifikation

10% FKS

2% Glutamat

1% Antibiotikum/Antimykotikum alle Sigma-Aldrich, Taufkirchen,
Deutschland

20ng/ml rekombinantes M-CSF (Ratte) #400-28, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA

50ng/ml rekombinantes RankL (Ratte) #400-30, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA

3.2.3 Neurotransmitter und spezifische Agonisten

Um den Einfluss der Neurotransmitter auf die Osteoklastogenese zu untersuchen, wurde dem Osteoklasten- oder Makrophagenmedium zusätzlich Acetylcholinchlorid (#A22661, 10^{-6} - 10^{-8} M Endkonzentration), L-(-)-norepinephrine (+)-bitartrat-Monohydrat (#N5785, 10^{-6} - 10^{-8} M Endkonzentration) und [rat/human/porcine] vasoaktives intestinales Peptid (#V6130, 10^{-9} - 10^{-11} M Endkonzentration; alle von Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) sowie der spezifische Agonist für die $\alpha 7$ Untereinheit des nikotinergen Acetylcholinrezeptors, ARR17779-Hydrochlorid (#3964, 10^{-6} - 10^{-8} M Endkonzentration, Tocris Bioscience, Bristol, Grossbritannien) zugegeben. Im Gegensatz zu den Rezeptoren für ACh und VIP, werden durch unterschiedliche Konzentrationen von NA verschiedene Rezeptorsubtypen angesprochen. Hohe Konzentrationen von NA (10^{-6} M) wirken über niedrigaffine β -

Adrenozeptoren und niedrige Konzentrationen (10^{-8}M) vorwiegend über hochaffine α -Adrenozeptoren.

Für Experimente zum Einfluss von cAMP auf Osteoklastogenese und Kathepsin K-Aktivität wurde der Adenylatzyklaseaktivator NKH 477 von Tocris verwendet (#1603, 10^{-6} - 10^{-8}M Endkonzentration, Bristol, Grossbritannien).

3.2.4 Herstellung knochenähnlicher Matrix

Für die *in vitro* Analyse der Resorptionsaktivität von Osteoklasten gibt es verschiedene Möglichkeiten. Neben kommerziell erhältlichen künstlichen Kalziumphosphat-Matrices wie zum Beispiel den Osteoassay-Oberflächen von Corning oder den mittlerweile in Deutschland nicht mehr erhältlichen „Osteologic Discs“ von BD BioCoat, gibt es auch die Möglichkeit natürliche Matrices, wie Dentin aus Elfenbein oder Knochenscheiben aus Rinderknochen, zu verwenden. Für die vorliegende Dissertation wurde ein gänzlich neuer Ansatz gewählt. Durch osteogene Differenzierung einer Osteosarkomzelllinie (SAOS-2) wurde in Standard 96well-Platten aus durchsichtigem Plastik (Corning, Corning, NY, USA) eine knochenähnliche Matrix, aus kristallinen und proteinogenen Komponenten produziert, die für die anschließenden Resorptionsexperimente genutzt wurde. Die Herstellung der Matrix erfolgte nach dem Protokoll von (228). Dazu wurden SAOS-2 Zellen in 96well-Platten ausgesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 80-90% in SAOS-2 Medium kultiviert. Anschließend wurde das Medium komplett gegen osteogenes Medium ausgetauscht und mit zweimaligem Mediumwechsel pro Woche wurden die Zellen so insgesamt für vier Wochen kultiviert. Am Boden des Wells war deutlich die Ablagerung einer Matrixähnlichen Schicht zu erkennen. Nach vier Wochen wurde das Medium abgesaugt und die Platten wurden mehrfach mit sterilem A_{dest} gewaschen. Um die SAOS-2 Zellen zu entfernen, wurden die Platten mit sterilem A_{dest} gefüllt und für mindestens 24 Stunden (Std.), meist aber bis zur Verwendung, bei 4°C gelagert, was eine Lyse der Zellen zur Folge hatte. Um restliche Zelltrümmer zu entfernen wurden die Platten vor Aussaat der Osteoklasten erneut gründlich mit sterilem A_{dest} gewaschen. Für jedes Experiment bestehend aus den vier Isolationszeitpunkten wurde eine Gesamtcharge von Matrixplatten produziert, um Unterschiede in der Matrixausbildung zu vermeiden.

SAOS-2 Medium

McCoy's 5A Medium (ohne Phenolrot) Biochrom/Merck Millipore, Berlin, Deutschland
15% hitzeinaktiviertes FKS
2% Glutamat
1% Antibiotika/Antimykotika alle Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Osteogenes Medium

Minimal Essential Medium, α Modifikation
10% hitzeinaktiviertes FKS
2% Glutamat
1% Antibiotika/Antimykotika alle Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
300 μ M Ascorbinsäure-2-Phosphat
10mM β -Glycerolphosphat
100nM Dexamethason

3.2.5 Resorptionsassay

Nachdem die SAOS-2 Matrix für den Resorptionsassay vorbereitet war, wurde das Osteoklastenmedium mit den entsprechenden Zusätzen (ACh, NA, VIP, ARR17779) in die Platte vorgelegt. Je 5 μ l der auf 1×10^6 KMM pro ml eingestellten Zellsuspension wurden mittels Multipette hinzupipettiert und die Platte anschließend 2 Min. bei 300xg zentrifugiert. Der Zentrifugationsschritt sollte sicherstellen, dass die Zellen gleichmäßig über das Well verteilt wurden und sich nicht, wie sonst beobachtet, vorrangig am Rand des Wells ansiedeln. Insgesamt wurden die Zellen so für vier Wochen kultiviert. Zweimal pro Woche wurde das Medium durch frisches Medium mit den entsprechenden Zusätzen ausgetauscht. Nach Ende der Kultivierungsperiode wurden die Platten mit A_{dest} gewaschen und die Zellen erneut in A_{dest} inkubiert und so lysiert. Anschließend wurde die kristalline Matrix nach der von Kossa Methode angefärbt und die Resorptionsaktivität der Zellen bestimmt.

3.3 Molekularbiologie

3.3.1 RNA Isolierung

3.3.1.1 RNA-Isolierung aus Osteoklasten

Die RNA-Isolierung aus Osteoklasten wurde mit dem „Absolutely RNA Mini- oder Microprep Kit“ von Stratagene (La Jolla, CA, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Osteoklasten wurden nach 5 Tagen Differenzierung direkt im Zellkulturbehälter mit dem Guanidinthiocyanat/ β -Mercaptoethanol-haltigen Lysepuffer des Isolationskits lysiert und bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Die Isolierung der RNA erfolgte in mehreren Schritten. Zuerst wurde der Lysepuffer durch einen Vorfilter (Mini-Kit) zentrifugiert und anschließend mit dem gleichen Volumen 70% Ethanol versetzt. Nachfolgend wurde die RNA an eine Glasfaser-Substrat-Säule gebunden und enthaltene DNA-Verunreinigungen mittels DNase-Verdau entfernt (15 Min., 37°C). Die gebundene RNA wurde mit Puffern mit ansteigendem Salzgehalt gewaschen und anschließend in einem Volumen von 20-50 μl eines auf 60°C erwärmten Elutionspuffers eluiert. Nach der Konzentrationsbestimmung bzw. Qualitätsüberprüfung (siehe 3.3.2.) wurde die erhaltene RNA bei -80°C gelagert oder direkt in cDNA umgeschrieben.

3.3.1.2 RNA-Isolierung aus Makrophagen

Für die RNA-Isolierung aus den KMM-Pellets wurde das Ambion „RNAqueous®-Micro total RNA Isolation Kit“ (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ebenfalls nach den Angaben des Herstellers verwendet. KMM wurden direkt nach der Vorkultur mittels EDTA/PBS aus der Petrischale abgelöst und pelletiert. Das Pellet wurde bis zur Bearbeitung bei -20°C aufbewahrt. Die Isolierung erfolgte analog zu 3.3.1.1., jedoch war der benutzte Filter wesentlich kleiner und so konnte die RNA in einem Volumen von 10-20 μl eluiert werden.

3.3.2 RNA-Konzentrationsbestimmung, Qualitätsüberprüfung und cDNA-Synthese

Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Nanodrop 1000-Spektrophotometers (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt. Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde der „RNA 6000 Nano Kit“ von Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) für den Agilent 2100 Bioanalyzer verwendet. Dieser chip-basierte Assay trennt RNA-Fragmente mittels Mikrokapillargel-Elektrophorese nach ihrer Größe auf und ermöglicht so die Unterscheidung

verschiedener RNA-Arten wie rRNA, mRNA und degradiert RNA. Die Reinheit wird als **RNA Integrity Number (RIN)** ausgegeben, wobei 10 für komplett intakte und 1 für degradierte RNA steht. Die RNA-Qualität von Osteoklasten wurde stichprobenartig überprüft, und lag meist bei einer $RIN > 8$. Die Qualität der Makrophagen-RNA war zumeist wesentlich schlechter mit RIN-Werten von teilweise 5-6.

Nach der Überprüfung wurde die RNA unter Verwendung des „Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kits“ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben.

Reaktionsansatz (0,3-3 µg RNA)

10 µl cDNA Synthesis Master Mix

3 µl Oligo(dT) oder Random Primer

1 µl AffinityScript RT/ RNase Block Enzyme Mixture

maximal 3 µg RNA

mit RNase-freiem H₂O auf 20 µl auffüllen

Die anschließende cDNA-Synthesereaktion wurde im T-Gradient Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die initiale Primeranlagerung erfolgte für 5 Min. bei 25°C, die cDNA-Synthese durch das Enzym Reverse Transkriptase erfolgte bei 42°C für 15 Min. Die Beendigung der Synthese wurde durch eine Inkubationsphase von 5 Min. bei 95°C erreicht. Die so synthetisierte cDNA wurde kurzzeitig bei 4°C und längerfristig bei -20°C aufbewahrt.

3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR ermöglicht die Vervielfältigung von DNA bzw. cDNA unter Verwendung des Enzyms DNA-Polymerase. Die Kettenreaktion entsteht in diesem Fall durch die Tatsache, dass die Syntheseprodukte eines Schrittes als Template für den nächsten Schritt dienen und so eine exponentielle Vervielfältigung des Ausgangsproduktes erreicht werden kann.

3.3.3.1 Qualitative Endpunkt-PCR

Aus dem isolierten cDNA-Gemisch von KMM und Osteoklasten wurden durch Verwendung spezifischer Primer (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland), aufgelistet in Tabelle 3-1, entsprechende Gene unter Verwendung der JumpStart Taq DNA Polymerase (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) im T-Gradient Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) vervielfältigt.

Material und Methoden

Reaktionsansatz

5µl 10x PCR-Puffer
 4µl Deoxynukleotid Mix (10mM)
 1µl Forward-Primer
 1µl Reverse-Primer
 1µl JumpStart Taq DNA Polymerase
 Xµl cDNA (20-100ng)
 mit A.dest auf 50 µl auffüllen

PCR-Parameter

- | | | |
|-----------------|--------------------------------|------------------------|
| 1) 94°C 1 Min. | initiale Denaturierung | |
| 2) 94°C 30 Sek. | Denaturierung | |
| 3) 60°C 30 Sek. | Annealing (Primeranlagerung) | |
| 4) 72°C 1 Min. | Extensionsphase (DNA-Synthese) | ← Schritt 2) 35 Zyklen |
| 5) 72°C 1 Min. | finale Extensionsphase | |
| 6) 4°C halten | | |

Die so amplifizierte cDNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.3.4.) und Ethidiumbromidfärbung mit einem Größenmarker verglichen.

Tabelle 3-1: Primersequenzen für qualitative Endpunkt-PCR und quantitative real-time-PCR

Gen-Name	Primersequenz [5'→3']	Tm [°C]	Amplicon- Größe [bp]	Acc.Nr.
Osteoclastenmarkergene				
Kathepsin K	Fwd: AGACGCTTACCCGTATGTGG	59.4	151bp	NM_031560
	Rev: GGACACAGAGACGGGTCCTA	61.4		
Calcitonin Rezeptor	Fwd: GATGCTGTGTGAGGGGATCT	59.4	152 bp	NM_001034015
	Rev: CGTTGTAGTAGACGGCACGA	59.4		
Kohlensäureanhydrase II	Fwd: TGGTTCACCTGGAACACCAAA	55.3	100 bp	NM_019291
	Rev: GAGGCAGGTCCAATCTTCAA	57.3		
Integrin αv	Fwd: GTCACCACGAACATCACCTG	59,4	108 bp	XM_003753778.1
	Rev: TACCAACACGGCCAGTAACA	57,3		
Integrin β3	Fwd: TGACATCGAGCTGGTGAAAG	57,3	224 bp	NM_153720.1
	Rev: GAGTAGCAAGGCCAATGAGC	59,4		
MMP-9	Fwd: TTCGACGCTGACAAGAAGTG	61.4	156 bp	NM_031055
	Rev: AGGGGAGTCCTCGTGGTAGT	57.3		
NFATc1	Fwd: ACGATGTGGAGGTGGAAGAC	59.4	161 BP	XM_002725364
	Rev: CTCATAGGAGGACGCCTCAG	61.4		

Material und Methoden

tartrat-resistente saure	Fwd: GAGAACGGTGTGGGCTATGT	59,4	131 bp	NM_019144
Phosphatase (TRAP)	Rev: GTGAAGCCACCCAGAGAGTC	61,4		
ATPase proton pump	Fwd: CCTCCTACTTGCGTCTCTGG	61,4	261 bp	NM_199089.2
subunit (Tcirg1)	Rev: TGTAGCCGGTCCCTGAATAG	59,4		
Rank Rezeptor	Fwd: AGGGAAAACGCTGACAGCTA	59,3	171 bp	NM_001271235
	Rev: ACCATCTTCTCCTCCCGAGT	59,7		
Neurotransmitter-Rezeptorgene				
VIP Rezeptor 1	Fwd: ATCCTCCTCTCCATCCTGGT	59,1	140 bp	NM_012685.2
	Rev: ATGAGCAGAAGCGTGACTT	59,7		
VIP Rezeptor 2	Fwd: CAGATGTTGGTGGCAATGAC	57,4	165 bp	NM_017238
	Rev: CCTGGAAGGAACCAACACAT	57,7		
PACAP Rezeptor 1	Fwd: ACGTCAGCAAGAGGGAAAGA	59,0	136 bp	NM_133511
	Rev: ACCTTCCAGCTCCTCCATTT	58,6		
M1 muskarinerg AChR	Fwd: ACAGCTGGCCAAGAGAAAGA	59,2	180 bp	NM_080773
	Rev: CATAGCCAGTAGCCCAGCTC	60,0		
M2 muskarinerg AChR	Fwd: GGTCAGAGTGGGGATGAAAA	57,1	135 bp	NM_031016
	Rev: AGCCAACAGGATAGCCAAGA	58,7		
M3 muskarinerg AChR	Fwd: ACAGCTGCATACCCAAAACC	58,7	205 bp	NM_012527
	Rev: GGCACCTCGCTTGTA AAAAT	57,6		
M4 muskarinerg AChR	Fwd: CAGAGCTGTATCCCCGAGAG	59,0	104 bp	NM_031547.1
	Rev: TTGAAAGTGGCATTGCAGAG	56,9		
M5 muskarinerg AChR	Fwd: CAG AGA AGC GAA CCA AGG AC	59,4	236 bp	NM_017362.4
	Rev: CTC AGC CTT TTC CCA GTC AG	59,4		
$\alpha 7$ nikotinerg AChR	Fwd: GCTCCTGCTACATTGACGTTT	59,8	105 bp	NM_012832.3
	Rev: GCATTTGCAGGTCCAGTGAC	59,4		
Adrenozeptor $\alpha 1A$	Fwd: TGATCCTCTCAGTGGCCTGTC	61,2	101 bp	NM_017191
	Rev: CAGCACAGTGGAGGTGAGGAG	62,4		
Adrenozeptor $\alpha 1B$	Fwd: AACCTTGGGCATTGTAGTCG	58,2	147 bp	NM_016991
	Rev: AGGCAGCTGTTGAAGTAGCC	60,3		
Adrenozeptor $\alpha 1D$	Fwd: CAA CCT GCT GGT CAT CCT TT	58,1	233 bp	NM_024483.1
	Rev: AGATGGTGCAGAGGCTAAGG	59,2		
Adrenozeptor $\alpha 2A$	Fwd: GTGTGTTGGTTCCCGTTCTT	58,6	149 bp	NM_012739
	Rev: CGGAAGTCGTGGTTGAAAAT	56,7		
Adrenozeptor $\alpha 2B$	Fwd: AGTTTTCTGTGGTCTGCTGGT	58,8	163 bp	NM_138505.2
	Rev: GTCCTGGTTGAAGACGGTGT	59,9		
Adrenozeptor $\alpha 2C$	Fwd: TCCGTCGAGTTCTTCTGTGTC	59,1	141 bp	NM_138506
	Rev: GAAGGGGAACCAGCACAGTA	59,3		
Adrenozeptor $\beta 1$	Fwd: TCAAGACACTGGGCATCATC	57,6	130 bp	NM_012701
	Rev: CCCAGCCAGTTGAAGAAGAC	58,5		
Adrenozeptor $\beta 2$	Fwd: CACATCGCCCTTCAAGTACC	59,6	116 bp	NM_012492
	Rev: ACCAGTGCATCTGGATAGGC	59,5		
Adrenozeptor $\beta 3$	Fwd: CGCACCTTGGGTCTCATTAT	57,7	150 bp	NM_013108
	Rev: GAAGGCAGAGTTGGCATAGC	59,0		

Material und Methoden

MCSF-Rezeptor Signalweg-assoziierte Moleküle				
Bcl2	Fwd: GGGAGCGTCAACAGGGAGATG	63,7	169 bp	NM_016993.1
	Rev: GACAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG	63,0		
Akt1	Fwd: CACCGTGTGACCATGAACGA	57,5	238 bp	NM_033230.2
	Rev: GGTCGTGGGTCTGGAATGAG	59,5		
SoS1	Fwd: TGGCACATAAGCAGACCTGG	57,5	115 bp	NM_001100716
	Rev: GCTGCACAGCTCGGTATAGA	57,5		
Grb2	Fwd: TAGAACAGGTGCCACAGCAGC	59,5	100 bp	NM_030846.2
	Rev: TGAATGAAGTCTCCTCGGCG	57,5		
Foxo3	Fwd: CGGCTCACTTTGTCCCAGAT	57,5	149 bp	NM_001106395.1
	Rev: TCGTTCTGAACCCGCATGAA	55,4		
M-CSF Rezeptor (csfr)	Fwd: TACTGCTGCTACGGAGACCT	57,5	147 bp	NM_001029901.1
	Rev: ACTGTCCCTGCGCACATATT	57,5		
Mapk1 (Erk1)	Fwd: TGCTTTCTCTCCCGCACAAA	55,4	185 bp	NM_053842.1
	Rev: AGCAATGGGCTCATCACTTG	55,4		
Mapk3 (Erk2)	Fwd: AACTCCAAGGGCTACACCAA	55,4	285 bp	NM_017347.2
	Rev: GGTTAACATCCGGTCCAGCA	57,5		
c-Myc	Fwd: TCGCCCAAATCCTGTACCTC	57,5	160 bp	NM_012603.2
	Rev: CATCTTGTCTTCTTCAGAGTCGC	57,9		
PU.1	Fwd: TGGAGAAGCTGATGGCTTGG	57,5	175 bp	AB154364.1
	Rev: GTGCTTGGACGAGAACTGGA	57,5		
Endogenes Kontrollgen ("Haushaltsgen")				
GAPDH	Fwd: TTG GTG GTG CAG GAT GCA TTG C	61,2	291 bp	NM_017008.3
	Rev: CAC AGT CAA GGC TGA GAA TGG G	64,5		

3.3.3.2 Quantitative real-time PCR

Unterschiedliche Genexpressionsraten zwischen Osteoklasten NaCl-behandelter und arthritischer Tiere wurden mittels quantitativer *real-time* PCR (qRT-PCR) untersucht. Dazu wurden spezifische Primer (Tabelle 3-1, MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland), der „Brillant II SYBR Green QPCR Master Mix“ (Stratagene, La Jolla, USA) und das *Mx3005P QPCR* System von Agilent Technologies benutzt. Durch Denaturierung wird aus dem Doppelstrang der interkalierende SYBR-Green-Farbstoff nach jedem Zyklus freigesetzt und die Fluoreszenzintensität gemessen. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität ist proportional zur Zunahme der PCR-Produkte und ermöglicht so eine Quantifizierung der Genexpression.

25µl Reaktionsansatz

Je 0,5µl (1 nM)	Forward- bzw Reverse-Primer
12,5µl	BrillantR II SYBR Green QPCR Master Mix

0,375µl	ROX-Referenz-Farbstoff
5µl (20-25ng)	cDNA
Auffüllen auf 25µl	A _{dest}

Die PCR-Ansätze wurden initial für 10 Min. bei 95°C denaturiert. Anschließend folgten 40 Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 30 Sekunden (Sek.), einem Annealing-Schritt bei 60°C für 60 Sek. und einem Elongationsschritt bei 72°C für 60 Sek.

Die Proben wurden in eine 96-Well-PCR-Platte (Kisker GbR, Steinfurt, Deutschland) als Duplikate aufgetragen und gemessene Ct-Werte (dRn) anschließend mit Hilfe der *MxPro QPCR Software für Mx3000P* und *Mx3005P QPCR* Systeme (Stratagene, La Jolla, USA) in Microsoft Excel übertragen und mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet. Dazu wurden die Ct-Werte der zu untersuchenden Gene auf die gemessenen Ct-Werte von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, „Haushaltsgen“) normiert und anschließend die erhaltenen Werte für die arthritischen Tiere auf die der NaCl-behandelten Kontrollen bezogen (relative Genexpression).

3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

100ng cDNA wurden mit Ladepuffer (6x Gel Loading Dye, Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) gemischt und auf ein Agarosegel mit einer Konzentration von 1,5% (w/v, Seakem Agarose, Lonza, Basel, Schweiz) in TAE Puffer mit ~20mg/ml Ethidiumbromid (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) aufgetragen. Die definierte Porengröße und das angelegte elektrische Feld (~90V, 45-60 Min.) bewirkten eine Auftrennung der cDNA-Fragmente nach ihrer Größe. Die Gele wurden unter UV-Licht in einer Geldokumentationsstation fotografiert (Intas UV Systems, Göttingen, Deutschland). Die Fragmentgröße konnte anhand eines Markers (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Fermentas – Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) mit Fragmenten definierter Größe verglichen werden.

TAE Puffer

0.8 mM Tris-Base	AppliChem, Gatersleben, Deutschland
0.8 mM Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
0.04 mM EDTA	AppliChem, Gatersleben, Deutschland
pH 7.8	

3.4 Proteinbiochemie

3.4.1 Kathepsin K-Enzymassay

Kathepsin K ist eine Cysteinprotease, die von Osteoklasten exprimiert wird und hauptsächlich für den Abbau der proteinogenen Knochenmatrix verantwortlich ist. Kathepsin K ist in der Lage die Peptidbindung des synthetischen Peptids Benzyloxycarbonyl-L-Leucyl-L-Arginine-4-methylcoumaryl-7-Amid (Z-Leu-Arg-AMC, Peptanova, Sandhausen, Deutschland) zu hydrolysieren und somit das fluoreszierende Molekül 7-Amino-4-Methylcoumarin freizusetzen (Methode modifiziert nach (229)). Mittels einer Standardkurve von 7-Amino-4-Methylcoumarin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) kann die Enzymaktivität von Kathepsin K im Zellkulturüberstand berechnet werden.

Es wurden 15.000 KMM pro Well in 24well-Platten (Corning, Corning, NY, USA) mit autoklavierten Glasplättchen (Menzel Gläser, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) 5 Tage in Osteoklastenmedium mit oder ohne ACh, NA, VIP, ARR17779 oder NKH 477 differenziert und anschließend das Medium gegen FCS-freies Medium mit oder ohne Zusätze ausgetauscht. Nach 24 Std. wurde der Überstand abgenommen, aliquotiert und entweder sofort für den Kathepsin K-Assay verwendet oder bei -80°C gelagert. Der Reaktionsansatz wurde in die Vertiefung einer durchsichtigen 96well-Platte (Corning, Corning, NY, USA) pipettiert, die Platte mit Parafilm abgedeckt und anschließend bei 37°C auf einem Vertikalschüttler bei ~200rpm inkubiert. Nach 24 Std. wurde die Reaktion durch Zugabe von 50µl Stopp-Puffer beendet und das Fluoreszenzsignal bei 465nm im Photometer gemessen (Anregung 365nm, Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz). Die Menge des freigesetzten 7-Amino-4-Methylcoumarin wurde auf die Gesamtproteinmenge pro ml Zellkulturüberstand bezogen.

Reaktionsansatz Kathepsin K-Assay

50µl Zellkulturüberstand

170µl Reaktionspuffer

10µl 500µM Z-Leu-Arg-AMC (verdünnt aus 5mM-Stocklösung)

Standard

220µl Reaktionspuffer

10µl 7-Amino-4-Methylcoumarin

(1. Standard 1:200 aus 0,05M Stocklösung, Blank: Reaktionspuffer)

Reaktionspuffer

0,1M Natriumacetat	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
1mM EDTA	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
pH 5,5	
0,1mM Dithiothreitol	Applichem, Gatersleben, Deutschland
➔ frisch zusetzen	

Stopp-Puffer

0,1M Tris	Applichem, Gatersleben, Deutschland
0,1M Iodessigsäure	Applichem, Gatersleben, Deutschland
pH 8	

3.4.2 BrdU Proliferations-Assay

Um die Proliferationskapazität der KMM zu bestimmen, wurde der kolorimetrische BrdU-Inkorporationsassay der Firma Roche verwendet. Das Assayprinzip beruht auf dem Einbau von 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) statt Thymidin während der DNA-Synthesephase der Mitose. BrdU kann mittels eines spezifischen Peroxidase (POD)- gekoppelten Antikörpers detektiert werden und nach Inkubation mit einer Substratlösung für POD, kann die Absorption im Spektralphotometer gemessen werden.

Pro Vertiefung einer 96well-Mikrotiterplatte (Corning, Corning, NY, USA) wurden 5000 KMM nach der Ernte ausgesät und über Nacht in Makrophagenmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach ca. 16 Std. wurde für 24 Std. auf FCS- und M-CSF-freies Medium gewechselt um die Zellen zu synchronisieren. Anschließend erfolgte der Mediumwechsel auf komplettes Makrophagenmedium mit oder ohne Neurotransmitter (ACh, VIP, NA, ARR17779) und den Kontrollansätzen mit DMSO und A._{dest.} In jedem Ansatz war BrdU aus dem Kit in 1:1000 Verdünnung enthalten. Als Blank diente Makrophagenmedium mit BrdU. Nachdem die Zellen für 48 Std. bei 37°C und 5% CO₂ proliferieren konnten, wurden die weiteren Schritte nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die Zellen erst fixiert und anschließend mit dem anti-BrdU-POD Antikörper für 90 Min. inkubiert und nach dem Waschschrift mit Substratlösung inkubiert bis die Blaufärbung ausreichend stark entwickelt war. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1M H₂SO₄ zugegeben und die Absorption bei 450nm mit einer Referenzwellenlänge von 690nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) gemessen.

3.4.3 Caspase 3/7 Assay

Die Aktivität der Caspase 3/7 wurde mittels Apo-ONE® Homogenous Caspase 3/7 Assay-Kit von Promega (Madison, WI, USA) in Makrophagen und Osteoklasten analysiert. Das Assayprinzip beruht auf der Freisetzung von fluoreszierendem Rhodamin 110 aus der nicht-fluoreszierenden Vorstufe bis-[N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide] (Z-DEVD-R110) durch Caspase 3/7 und ist ein Maß für die apoptotische Aktivität von Zellen.

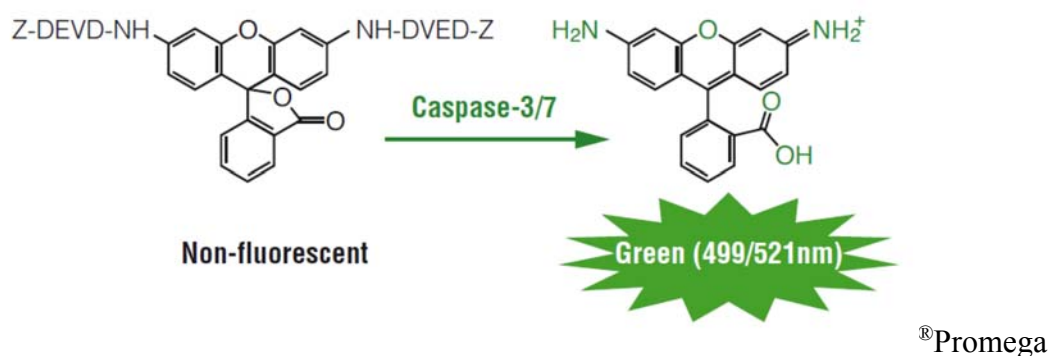


Abbildung 3-1: Prinzip des Apo-ONE Homogeneous Caspase 3/7 Assays von Promega.

Durch Spaltung des nichtfluoreszierenden Moleküls Z-DEVD-R110 durch Caspase 3/7 wird das fluoreszierende Rhodamin 110 freigesetzt und kann photometrisch bestimmt werden.

3.4.3.1 Knochenmark-Makrophagen

Nach der Ernte wurden 5000 KMM pro Well in Makrophagen-Medium in schwarze 96-Well-Platten mit lichtdurchlässigem Boden (BD Microplates, San Jose, CA, USA) ausgesät. Nach 16-18 Std. wurde auf α MEM mit 2% Glutamat und 1% Antibiotikum/Antimykotikum (alle Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gewechselt um die Zellen zu synchronisieren. Nach 24 Std. wurde das Medium durch komplettes Makrophagen-Medium mit M-CSF und den jeweiligen Neurotransmittern ersetzt (50 μ l pro well, ACh, NA, VIP, ARR17779) und 50 μ l Caspase-Substrat (Substratlösung 1:10 in Zelllyse/Aktivitätspuffer) zugegeben. Nach 6-10 Std. wurde die Fluoreszenz des durch Caspase 3/7 Aktivität freigesetzten Fluorophors bei 521nm im Mikrotiterplatten-Photometer (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) gemessen.

3.4.3.2 Osteoklasten

Um die Caspase 3/7-Aktivität in Osteoklasten zu bestimmen, wurden 5000 KMM wie unter 3.4.3.1. ausgesät und für 5 Tage in Osteoklasten-Medium ohne Zusätze differenziert, mit einem Mediumwechsel an Tag 3. Anschließend wurde analog zu 3.4.3.1. verfahren.

3.4.4 Kristallviolett-Adhäsionsassay

Das Prinzip des Kristallviolett-Assays beruht auf der Inkorporation des Farbstoffes Kristallviolett in die Zelle. Nach einer definierten Adhäsionszeit und dem Entfernen ungebundener Zellen durch gründliches Waschen, wird der Farbstoff durch Ethanol wieder aus der Zelle herausgelöst und die Absorption mittels Photometer bestimmt. Die Höhe der Absorption ist dabei proportional zur Farbstoffmenge und damit zur Zellmenge pro Kavität. Durch Vergleich gegen eine Kontrollgruppe kann so der Einfluss verschiedenster Faktoren auf die Adhäsionskapazität untersucht werden. Nach der Isolierung wurden 5000 KMM pro Kavität in einer 96well-Mikrotiterplatte aus unbehandeltem Plastik (Corning, Corning, NY, USA) in Makrophagenmedium allein (unstimuliert) oder in Gegenwart von ACh, NA, VIP und dem $\alpha 7$ nAChR-Rezeptoragonisten ARR17779 ausgesät. Für die Untersuchungen zur Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix wurden vorgefertigte Platten mit Kollagen I-Beschichtung (Corning BioCoat Kollagen I, 96-Well, klar, Flachboden #354407, Charge 13514028), Fibronectin-Beschichtung (Corning BioCoat Fibronectin, 96-Well, klar, Flachboden #354409, Charge 4048010) sowie Laminin-Beschichtung (Corning BioCoat Laminin, 96-Well, klar, Flachboden, #354410, Charge 3038521) analog zu den oben beschriebenen Experimenten zur Adhäsion an Plastik untersucht.

Nach 36 Std. bei 37°C und 5% CO₂, wurden die KMM in 1% Glutaraldehyd-Lösung für 30 Min. fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit A_{dest} wurden die Zellen 15 Min. mit 0,02% Kristallviolettlösung gefärbt und anschließend solange gewaschen bis das A_{dest} keine Blaufärbung mehr anzeigte (5-6mal). Das in den Zellen enthaltene Kristallviolett wurde nach Inkubation in 150µl 70% Ethanol für 3 Std. bei 100rpm (Vertikalschüttler) aus den Zellen herausgelöst. Die Messung der Absorption erfolgte bei 595nm im Mikrotiterplatten-Photometer (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz).

3.4.5 Proteinbestimmung in Zellkulturüberständen

Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt, der auf der Biuret-Reaktion beruht. Dabei reduzieren die Peptidbindungen der Proteine Cu²⁺ unter alkalischen Bedingungen zu Cu⁺, welches anschließend von Bicinchoninsäure (BCA) in einem violetten Chelat-Komplex gebunden wird, der bei 562nm spektralphotometrisch erfasst werden kann. Die enthaltene Proteinmenge ist proportional zu

der Menge an reduziertem Cu^{2+} und kann daher anhand einer mitgeführten Standardreihe mit definiertem Proteingehalt bestimmt werden.

Als Proteinstandard diente Bovines Serum Albumin (BSA), welches mit A_{dest} zu einer seriellen Standardreihe (0 - 2000 µg/ml) verdünnt wurde. 10µl jedes Standards, beziehungsweise jeder zu messenden Probe, wurden in 200µl BCA-Arbeitslösung pipettiert und für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Es erfolgte jeweils mindestens eine Doppelbestimmung. Die Absorption von Proben und Standard wurde anschließend in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Tecan AG, Männedorf, Schweiz) bei 560nm gemessen und anhand einer linearen Kalibrierungskurve die Proteinkonzentration in µg/ml bestimmt.

3.5 Histologie und Immunfluoreszenzfärbung

3.5.1 Tartrat-resistente saure Phosphatase-Färbung

Um das Vorhandensein der tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) nachzuweisen, einem Osteoklastenmarker, der auch von den Vorläuferzellen exprimiert wird, wurden die Zellen mittels des „Acid phosphatase, Leukocyte (TRAP)“-Kits von Sigma-Aldrich (#A387, Taufkirchen, Deutschland) nach den Instruktionen des Hersteller fixiert und angefärbt.

Es wurden 15.000 KMM in 24well-Platten (Corning, Corning, NY, USA) mit autoklavierten Glasplättchen (Menzel Gläser, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) 5 Tage in Osteoklastenmedium mit oder ohne ACh, NA, VIP, ARR17779 oder NKH 477 differenziert, mit einem Mediumwechsel (und entsprechenden Zusätzen) nach 3 Tagen. Nach Entfernen des Kulturmediums wurden die Zellen für 30 Sek. in Citrat-Puffer/Aceton/Formaldehyd in der Platte fixiert und zweimal mit A_{dest} gewaschen und anschließend für 60 Min. bei 37°C mit 300µl der Färbelösung inkubiert. Die Farbreaktion beruht auf der Hydrolyse des Phosphatesters der Naphthol AS-BI Phosphorsäure durch TRAP, und der anschließenden Reaktion mit dem diazotierten „Fast Garnet GBC“-Salz zu einem schwerlöslichen Farbstoff. Auf eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurde verzichtet, da schnell eine Überfärbung der Zellen auftrat. Positiv gefärbte Zellen, Osteoklasten und auch Makrophagen, erscheinen rot-violett, in einigen Fällen auch eher bräunlich-rot. Zellen mit drei und mehr Zellkernen wurden als Osteoklasten gewertet und gezählt.

Reaktionsansatz (50ml)

45ml

37°C A_{dest}

1ml	Diazot. Fast Garnet GBC (1:1 Fast Garnet GBC / Natriumnitrit)
0,5ml	Naphthol AS-BI Phosphorsäure
2ml	Azetatlösung
1ml	Tartrat-Lösung

3.5.2 von Kossa-Matrixfärbung

Die Färbung beruht auf der Reaktion von Silberionen mit dem Phosphat der Matrix und der anschließenden Oxidationsreaktion des Silbers unter UV-Licht. Vorhandene Matrix erscheint schwarz bis dunkelbraun und kann so von den Stellen, die durch Osteoklasten resorbiert wurden unterschieden werden. Die Matrix-Platten wurden nach Ende des Resorptionsassays mindestens 24 Std. in A._{dest} inkubiert und so die verbliebenen Zellen lysiert. Nach mehrmaligem waschen wurden die Platten in einer 1%igen Silbernitratlösung für 3 Std. unter UV-Licht (Sterilbank) inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde 5%ige Thiosulfatlösung zugegeben um das restliche ungebundene Silbernitrat zu entfernen. Nach dem abschließenden Waschen mit A._{dest}, wurden die Platten getrocknet und bis zur Analyse im Dunkeln gelagert. Die Platten wurden mit dem TissueFAXS System (DFG-Nr. INST 89/341-1 FUGG) der Firma TissueGnostics (Wien, Österreich) gescannt. Dafür wurden von jedem Well circa 80 Einzelbilder in hundertfacher Vergrößerung aufgenommen und von der Software zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Die Analyse der Resorptionsstellen erfolgte nach Verblindung manuell unter Verwendung eines Bamboo Fun & Touch Pads (Bamboo Fun Pen & Touch, Wacom, Saitama, Japan) und Photoshop CS4 (Adobe, San José, CA, USA).

3.5.3 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Analyse der Rezeptorexpression wurden 10.000 KMM pro Vertiefung auf Objektträger mit 8 integrierten Zellkulturkammern (8-Well-Chamber-Slide, BD Bioscience, San Jose, CA, USA) ausgesät und 5 Tage in Osteoklastenmedium differenziert. Anschließend wurden die Zellen 10 Min. in 4% Paraformaldehyd fixiert, mit PBS gewaschen und 20 Min. bei Raumtemperatur (RT) in 5% Ziegen Serum (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) inkubiert um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit den primären Antikörpern gegen den muskarinergen ACh-Rezeptor M5, den nikotinergen ACh-Rezeptor $\alpha 7$, PACAP-Rezeptor 1 sowie die Adrenozeptoren $\alpha 1D$, $\alpha 2B$ und $\beta 2$ erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Verdünnung aller Antikörper erfolgte in 1% Ziegen Serum in PBS. Die entsprechenden Antikörper und die verwendete Verdünnung sind in Tabelle 3-2

zusammengefasst. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem Ziege anti-Kaninchen F(ab')₂-Fragment gekoppelt an Alexa 488 für 1 Std. bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Zellkerne mit 4',6-diamidino-2-Phenylindol (DAPI) gegengefärbt und die Objektträger mit „Fluorescence Mounting Medium“ von Dako (Hamburg, Deutschland) überschichtet und mit einem Glasplättchen abgedeckt. Die Färbung wurde anschließend in einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse TE2000-U, Tokyo, Japan) fotografiert und mit Photoshop CS4 (Adobe, San José, CA, USA) bearbeitet.

3.6 Durchflusszytometrische Analysen

Mittels Durchflusszytometer können Zellen mit hoher Geschwindigkeit einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet werden, der durch die Beschaffenheit der Zelle abgelenkt wird. Diese Beugungsstrahlen werden mit verschiedenen Detektoren erfasst und ermöglichen so Aussagen über Größe (FSC - Forward Scatter) und Granularität (SSC - Side Scatter) der Zelle. Markiert man zusätzlich spezielle Moleküle mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern, die mittels Laser angeregt werden können, erlaubt die Durchflusszytometrie die Analyse einer großen Vielfalt von Fragestellungen in einer großen Anzahl von Zellen in sehr kurzer Zeit. Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurde ein BD FACS Calibur™ der Firma BD Biosciences verwendet.

3.6.1 Zellzyklus

Das Prinzip beruht auf der Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs Propidiumiodid (PI) in die DNA einer Zelle, deren Signal dann mittels Durchflusszytometrie gemessen werden kann. Der Zellzyklus besteht aus drei Phasen: die G₁/G₀-Phase bezeichnet den Zeitraum zwischen Kernteilung und DNA-Synthese in der Zellbestandteile, sowie Moleküle für die Synthesephase der DNA produziert werden; in der S-Phase, der Synthese-Phase, erfolgt die Verdopplung der DNA und in der abschließenden Phase (G₂/M-Phase) erfolgt letztendlich die Mitose und der Eintritt in eine weitere Zellzyklusrunde oder in das Differenzierungsstadium. Um Unterschiede in der Verteilung der Zellzyklusstadien zwischen KMM von Kontrolltieren und arthritischen Tieren zu bestimmen, wurde eine Zellzyklusanalyse mittels PI durchgeführt. In einer 100x20mm Petrischale wurden 1,5-2 Millionen KMM ausgesät und in Makrophagenmedium für 16 Std. kultiviert. Anschließend wurde für 48 Std. Serum und M-CSF entzogen, um die Zellen in der G₁/G₀-Phase zu synchronisieren. Danach wurde erneut Makrophagenmedium zugegeben und nach weiteren 48 Std. die Zellen für die

Zellzyklusanalyse geerntet. Das Ablösen der Makrophagen erfolgte mit 5mM EDTA/Trypsin/PBS auf Eis und 1 Min. Inkubationsphase bei -20°C. Um eine komplette Ablösung zu erreichen wurde zusätzlich ein Zellschaber verwendet und anschließend die Zellen für 5 Min. bei 245xg pelletiert. Das Zellpellet wurde in kaltem 2%igem BSA/PBS gewaschen, zentrifugiert und anschließend 10 Min. in einem Methanol-Aceton-Gemisch (3:1) fixiert. Nach dem Verdau von RNA mit RNase (1mg/ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) für 1 Std. bei 37°C wurde die DNA mittels PI (50µg/ml für 1x10⁶ Zellen in 500µl, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) angefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung wurde mit dem Zellzyklus-Tool der FlowJo Software (Treestar, Ashland, OR, USA) durchgeführt.

3.6.2 Oberflächenmarker und Integrinexpression

Für die Analyse der Oberflächenmarker wurden KMM nach der Ernte über Nacht bei 4°C im Rotor aufbewahrt und anschließend 5 Min. bei 245xg zentrifugiert. Die Integrinfärbung erfolgte direkt nach der Ernte der KMM. Die Analyse der Oberflächenmarker auf nativen Knochenmarkzellen erfolgte noch am Tag der Isolierung des Knochenmarks, wofür noch vor Lyse der Erythrozyten 20 Millionen Zellen entnommen und bis zur Färbung bei 4°C aufbewahrt wurden. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation in 5% Ziegen Serum (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) für 30 Min. bei 4°C geblockt. Für die Analyse der Integrinexpression und der Charakterisierung von nativem Knochenmark wurde zusätzlich ein monoklonaler Maus anti-Ratte CD32-Antikörper in die Zellsuspension gegeben. Dieser Antikörper blockiert die unspezifische Bindung von Antikörpern über ihren Fc-Teil an FcγIII-Rezeptoren, die zahlreich von Makrophagen exprimiert werden. Anschließend erfolgte die Inkubation der nativen Knochenmarkzellen mit Antikörpern gegen CD11b, EMR1 (*EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*, Pan-Makrophagenmarker) und CD90 sowie den entsprechenden Isotypkontrollen. Die nach 2-tägiger Vorkultur geernteten KMM wurden mit Antikörpern gegen CD11b, EMR1, CD90 und, für die Analyse der Integrinexpression, mit Antikörpern gegen CD29 und CD51/CD61 sowie den entsprechenden Isotypkontrollen inkubiert. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Tabelle 3-2 aufgelistet. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 4°C für 30 Min. Nach einem Waschschrift mit 2% FKS/PBS wurden ungekoppelte primäre Antikörper mittels Alexa 488-gekoppelten F(ab')₂ Fragmenten gegen die entsprechende Spezies, detektiert (dunkel, 30 Min., 4°C). Nach einem weiteren Waschvorgang in 2% FKS/PBS wurden die Zellpellets in

2% FKS/PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer die Expression der entsprechenden Marker analysiert

Die Auswertung der Oberflächenmarkerexpression auf KMM wurde mit der FlowJo Software (Treestar, Ashland, OR, USA) durchgeführt. Die Auswertung der Oberflächenmarkerexpression auf nativen Knochenmarkzellen und die Integrinexpression auf KMM erfolgte mit der Software Flowing 2.5.1 (entwickelt von Perttu Terho, Zentrum für Biotechnologie Turku, Finnland).

Tabelle 3-2: Antikörperliste für Immunfluoreszenzfärbungen und Durchflusszytometrie

Antigen	Host	Klonalität	Reaktivität	Verdünnung	Hersteller
Immunfluoreszenz					
Acetylcholinrezeptor nikotinerg $\alpha 7$ Untereinheit	Kaninchen	polyklonal	Maus, Ratte	1:300	Abcam, ab23832
Acetylcholinrezeptor M5, muskarinerg	Kaninchen	polyklonal	Ratte	1:400	Abcam, ab41171
Adrenozeptor $\alpha 1D$	Kaninchen	polyklonal	Human, Maus, Ratte	1:100	Alomone Labs, AAR-019
Adrenozeptor $\alpha 2B$	Kaninchen	polyklonal	Human, Maus, Ratte	1:100	Alomone Labs, AAR-021
Adrenozeptor $\beta 2$	Kaninchen	polyklonal	Human, Maus, Ratte	3 μ g/ml	abcam, ab36956
PACAP Rezeptor 1 (H-55)	Kaninchen	polyklonal	Human, Maus, Ratte	1:50	Santa Cruz, sc-30018
Durchflusszytometrische Analysen					
CD11b IgA PE-konjugiert	Maus	monoklonal	Ratte	1 μ g/ 1x10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen #562105
CD29, Integrin $\beta 1$, IgM PE-konjugiert	Armenischer Hamster	monoklonal	Ratte	1 μ g/ 1x10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen #562154
CD32, Fc-Block	Maus	monoklonal	Ratte	1 μ l/ 1x10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen #550270
CD51/CD61, Integrin $\alpha v\beta 3$, IgG unkonjugiert	Kaninchen	polyklonal	Ratte	1 μ g/ 1x10 ⁶ Zellen	Antibodies- online GmbH ABIN674784
CD90, IgG1 FITC-konjugiert	Maus	monoklonal	Ratte	1 μ g/ 1x10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen #554897
EMR1, pan- Makrophagenmarker, IgG1 unkonjugiert	Maus	monoklonal	Ratte	1,5 μ g/ 1x10 ⁶ Zellen	BMA Biomedicals #T-3005
Isotypen					
IgA PE-konjugiert	Maus	monoklonal	Ratte	1 μ g/ 1x10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen #562141
IgG1 unkonjugiert	Maus	monoklonal	Ratte	1,5 μ g/ 1x10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen #554121
IgG1 FITC-konjugiert	Maus	monoklonal	Ratte	1 μ g/ 1x10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen #550616
IgG unkonjugiert	Kaninchen	polyklonal	Ratte	1 μ g/ 1x10 ⁶ Zellen	Abcam ab171870
IgM PE-konjugiert	Armenischer Hamster	monoklonal	Ratte	1 μ g/ 1x10 ⁶ Zellen	BD Pharmingen #562114
Sekundäre Antikörper					
F(ab') ₂ Fragment Alexa 488-konjugiert	Ziege		Maus	1:400	Life Technologies A-11017
F(ab') ₂ Fragment Alexa 488-konjugiert	Ziege		Kaninchen	1:400	Life Technologies A-11070

3.7 Statistische Analyse

Die statistische Datenauswertung erfolgte unter Verwendung des Programmes Prism 4 der Firma GraphPad Software (San Diego, CA, USA). Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) oder als Boxplot dargestellt. Die Boxen der Boxplots zeigen den Median sowie die oberen und unteren Quartile der Daten. Die Whisker umfassen entweder den Datenbereich vom Minimum zum Maximum oder zeigen das zehnte bis neunzigste Perzentil der Datensätze (zutreffendes ist in der jeweiligen Abbildungslegende angegeben). Die Einflüsse der Neurotransmitterstimulation wurden als prozentuale Anteile bezogen auf die unstimulierten Zellen der jeweiligen Bedingung (NaCl-Kontrolle oder CIA) dargestellt und signifikante Unterschiede mittels nicht-parametrischem Wilcoxon Signed-Rank Test berechnet. Unterschiede in den Stimulationseffekten zwischen den Kontroll- und den CIA-Gruppen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Induktion von Kollagen Typ II-induzierter Arthritis

Um die erfolgreiche Induktion der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis (CIA) zu verifizieren, wurden zu jedem Versuchszeitpunkt das Gewicht der Tiere sowie der experimentelle Arthritis-Score bestimmt.

Abbildung 4-1A zeigt deutlich die Gewichtszunahme der NaCl-behandelten Ratten (Kontrollen) im Verlauf des 40 Tage dauernden Versuchsansatzes. Bei den immunisierten Tieren hingegen, kann ab Tag 15, der mit dem Auftreten erster Symptome assoziiert ist, eine Gewichtsreduktion beobachtet werden. Zum akuten Zeitpunkt der CIA (Tag 20) waren arthritische Tiere durchschnittlich 15% leichter als die entsprechenden Kontrolltiere. Im weiteren Verlauf der CIA bis zur chronischen Phase (Tag 40) nahmen die immunisierten Tiere erneut Gewicht zu, waren aber immer noch signifikant leichter als die NaCl-behandelten Kontrollen.

Zu jedem Versuchszeitpunkt wurden auch die Gelenke von Kontrollen und immunisierten Tieren auf Symptome für entzündliche Veränderungen untersucht. Die Bewertung erfolgte dabei wie unter 3.1.3 beschrieben. Während bei den NaCl-behandelten Ratten keine Anzeichen entzündlicher Veränderungen beobachtet wurden, stieg der Arthritis-Score immunisierter Tiere ab Tag 15 stark an und blieb während der restlichen Versuchszeit signifikant erhöht (Abb. 4-1B).

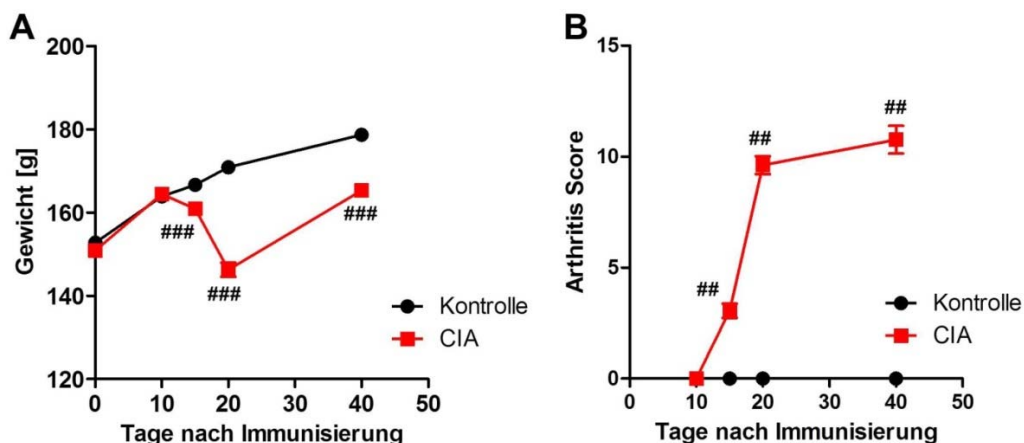


Abbildung 4-1: Kollagen Typ II-induzierte Arthritis.

Die erfolgreiche Induktion der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis wurde mittels Dokumentation von Gewichtsveränderungen (A) und experimentellem Arthritis-Score (B) von arthritischen und NaCl-behandelten Kontrolltieren im Zeitverlauf der Arthritis nachverfolgt.

N (Kontrolle/CIA) = 10d (126/128), 15d (106/108), 20d (92/94), 40d (71/72).

Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. ##p<0,01, ###p<0,001.

4.2 Untersuchungen zu Knochenmark-Makrophagen

4.2.1 Anzahl der isolierten Knochenmark-Makrophagen und Charakterisierung von Oberflächenmarkern

Um KMM aus dem Gesamtknochenmark zu isolieren wurden ihre Fähigkeit zur Adhärenz an unbehandelte Plastikoberflächen genutzt. Nach einer zweitägigen Vorkultur in Medium mit M-CSF wurden die adhärennten KMM geerntet und ihre Anzahl bestimmt. Für die Zeitpunkte 10, 15 und 40 Tage nach Immunisierung konnte kein Unterschied in der Anzahl der isolierten KMM immunisierter Ratten und NaCl-behandelter Ratten festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde für den akuten Arthritis-Zeitpunkt eine signifikante Reduktion in der KMM-Anzahl aus immunisierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet (Abb. 4-2A). Um die Reinheit der erhaltenen Zellpopulation zu überprüfen, wurden die KMM auf die Expression von Oberflächenmarkern untersucht, die mit Makrophagen assoziiert werden: zum einen CD11b, der von Monozyten, Granulozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen exprimiert wird; zum anderen EMR1, einem Pan-Makrophagenmarker. Als ein Negativ-Marker wurde CD90 überprüft, der unter anderem mit mesenchymalen Stammzellen in Verbindung gebracht wird (230). Abbildung 4-2B und C zeigen, dass sowohl für CD11b als auch für EMR1, das Fluoreszenzsignal deutlich positiv gegenüber der Isotypkontrolle war. Die Anzahl von CD11b- und EMR1-positiven Zellen lag bei ~90% und es wurden keine Unterschiede in den Expressionsmustern zwischen KMM aus immunisierten und NaCl-behandelten Tieren festgestellt (Abb. 4-2D). Eine Expression von CD90 konnte nicht nachgewiesen werden, was für eine große Reinheit der isolierten KMM-Population spricht (Daten nicht gezeigt).

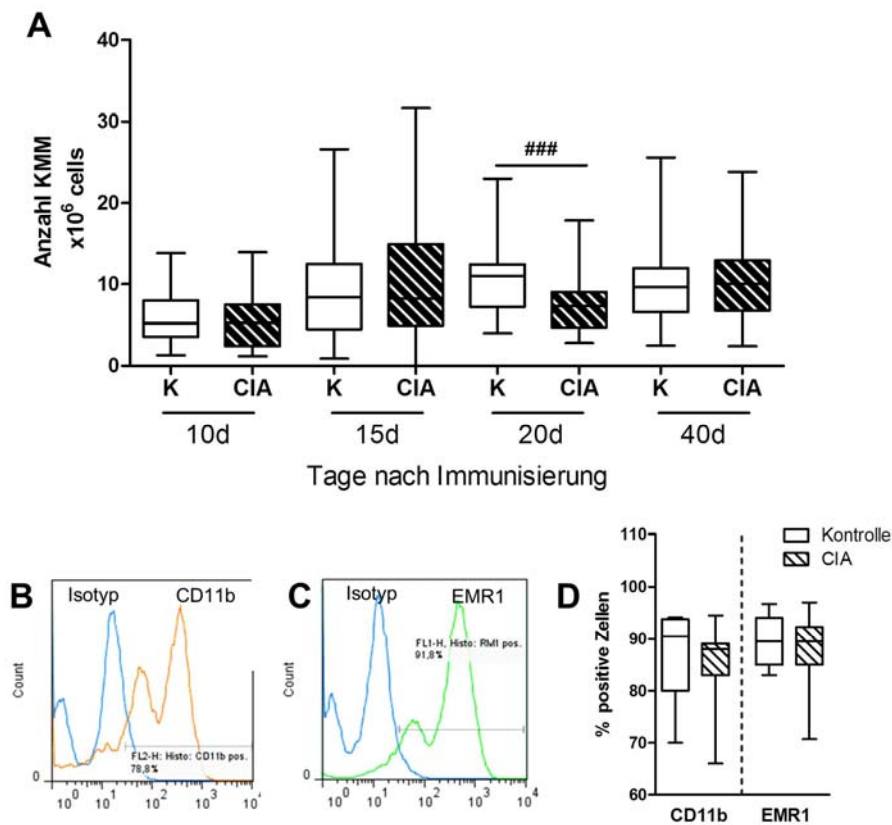


Abbildung 4-2: Anzahl der Knochenmark-Makrophagen und Charakterisierung von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie.

A) Anzahl der Plastik-adhärenenten KMM aus dem Knochenmark von immunisierten und NaCl-behandelten Tieren 10, 15, 20 und 40 Tage nach Behandlung, nach 2 Tagen Vorkultur mit M-CSF. N (Kontrolle/CIA) = 10d (31/31), 15d (29/29), 20d (31/32), 40d (37/37). ###p<0,001.

Expression der Makrophagen-Oberflächenmarker EMR1 (B) und CD11b (C) auf KMM nach zwei Tagen Vorkultur mit M-CSF und Unterschiede in der Expression von NaCl-behandelten und immunisierten Tieren (D). CD11b N = 7, EMR1 N = 8 (N fasst unterschiedliche Arthritiszeitpunkte zusammen und enthält jeweils gepoolte KMM aus 1-3 Kontroll- oder CIA-Tieren).

Die Box-Plots zeigen den Median und den Interquartilsabstand der Werte, die Whisker umfassen Minimum und Maximum der Werte.

Um zu untersuchen, ob der Unterschied in der KMM-Anzahl 20 Tage nach Immunisierung auf eine reduzierte Anzahl von KMM im Gesamt-KM zurückzuführen ist, wurden native Knochenmarkzellen auf die Expression von CD11b, EMR1 und CD90 untersucht.

Im Knochenmark, das eine Vielzahl unterschiedlicher Zellpopulationen enthält, konnte sowohl in NaCl-behandelten Tieren als auch in arthritischen Tieren die Expression von CD11b (Abb. 4-3B, C), EMR1 (ABB. 4-3F, G) sowie von CD90 (Abb. 4-3 D, E) festgestellt werden.

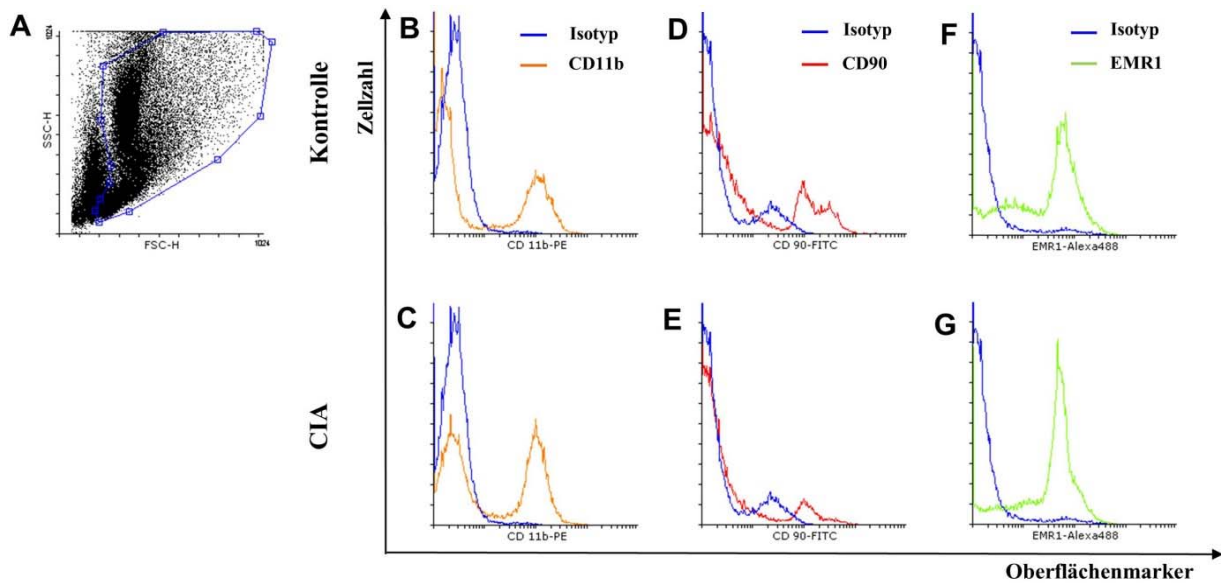


Abbildung 4-3: Durchflusszytometrische Untersuchung zur Expression von CD11b, EMR1 und CD90 auf nativen Knochenmarkzellen von immunisierten und NaCl-behandelten Ratten.

Zellen des Gesamt-Knochenmarks (A) von NaCl-behandelten und arthritischen Tieren sind, verglichen mit der entsprechenden Isotypkontrolle, positiv für Makrophagen-Marker wie CD11b (B, C) und EMR1 (F, G) sowie für CD90 (D, E).

Beim Vergleich der Anteile der jeweiligen positiven Zellen an der Gesamtzellmenge wurden im akuten Arthritis-Stadium deutliche Unterschiede zwischen dem Knochenmark NaCl-behandelter Tiere und dem Knochenmark immunisierter Tiere sichtbar. Der Anteil CD11b- und EMR1-positiver Zellen war signifikant höher in den immunisierten Tieren, während der Anteil CD90-positiver Zellen in den arthritischen Tieren signifikant reduziert war (Abb. 4-4A). Mit dem Erreichen der chronischen Arthritis-Phase (Tag 40) war der Effekt im Knochenmark arthritischer Ratten nicht mehr nachweisbar (Abb. 4-4B).

Um diesen Gegensatz zwischen einer erhöhten Makrophagenanzahl *in vivo* und einer niedrigeren Anzahl von KMM akut arthritischer Tiere nach 2 Tagen *in vitro*-Vorkultur aufzuklären, wurden weitere Untersuchungen zur Adhäsion, Caspase 3/7-vermittelter Apoptose und zur Proliferation von KMM durchgeführt, die in den nachfolgenden Abschnitten genauer beschrieben werden.

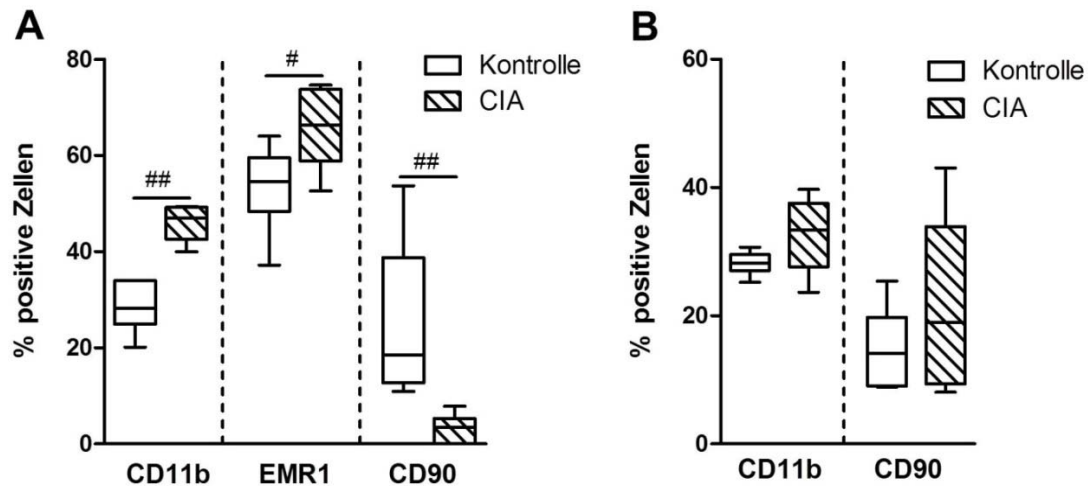


Abbildung 4-4: Der Einfluss akuter und chronischer Arthritis-Stadien auf die Anzahl CD11b-, EMR1- und CD90-positiver Zellen im Knochenmark.

(A) zeigt den Anteil CD11b-, EMR1 und CD90-positiver Zellen im Knochenmark akut arthritischer Ratten (20d) im Vergleich zu NaCl-behandelten Ratten und (B) vergleicht den Anteil CD11b- und CD90-positiver Zellen im Knochenmark chronisch-arthritischer Ratten (40d) mit entsprechenden Knochenmarkszellen NaCl-behandelter Ratten.

N = 6 für Kontrolle und CIA pro Zeitpunkt. [#]p < 0,05, ^{##}p < 0,01.

Die Box-Plots zeigen den Median und den Interquartilsabstand der Werte, die Whisker umfassen Minimum und Maximum der Werte.

4.2.2 Rezeptor-Expression für Acetylcholin, Noradrenalin und vasoaktives intestinales Peptid

Um eine Reaktivität für die Stimulation mit ACh, NA oder VIP zu gewährleisten, müssen die KMM spezifische Rezeptoren für die entsprechenden Neurotransmitter besitzen. Initial wurde mittels qualitativer PCR überprüft, ob KMM mRNA für Rezeptoren von ACh, NA und VIP exprimieren. Die Analyse umfasste die 5 muskarinergen ACh Rezeptoren M1-M5, den nikotinergen $\alpha 7$ nACh-Rezeptor, die VIP-Rezeptoren 1 und 2, sowie den alternativen VIP-Rezeptor PACAP-Rezeptor 1 und die verschiedenen adrenergen Rezeptoren der α -Klasse ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1D$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$) und der β -Klasse ($\beta 1-3$).

Es konnte die Genexpression der muskarinergen ACh Rezeptoren M1, M3 und M5 nachgewiesen werden, sowie der adrenergen Rezeptoren $\alpha 1A$ und $\alpha 1D$, $\alpha 2A-C$ und der β -Adrenozeptoren $\beta 1-3$. VIP-Rezeptoren konnten auf mRNA-Ebene nicht detektiert werden (Abb. 4-5).

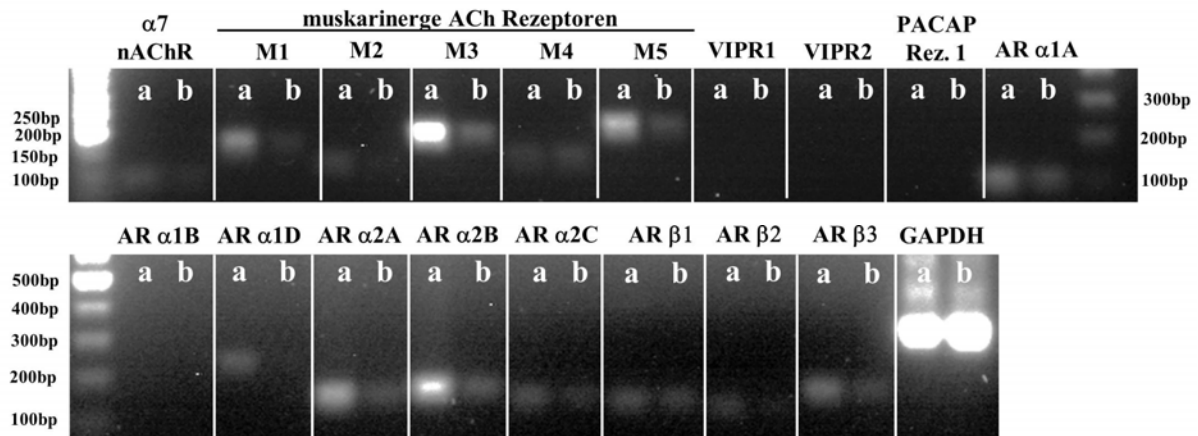


Abbildung 4-5: Endpunkt-PCR mit Primern für Neurotransmitter-Rezeptoren.

Nachweis der mRNA-Expression mit Primern für Rezeptoren für ACh, NA und VIP in KMM von Kontrolltieren 10 (a) und 20 (b) Tage nach NaCl-Behandlung mittels Endpunkt-PCR. N = 1.

Für den Rezeptornachweis auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden die Adrenozeptoren $\alpha 1D$, $\alpha 2B$ und $\beta 2$, der muskarinerge ACh-Rezeptor M5 sowie der alternative VIP-Rezeptor PACAP-Rezeptor 1 nach einer Literatursuche ausgewählt. Alpha2-Adrenozeptoren (AR) können die TNF-Freisetzung durch Makrophagen regulieren, wobei sie unter normalen Bedingungen die Sezernierung pro-inflammatorischen TNFs begünstigen, während sie unter pathologischen Bedingungen, wie in einem Tiermodell für chronische Schmerzen („*chronic constriction injury model*“) gezeigt wurde, die Freisetzung von TNF inhibieren (231). Das differentielle Verhalten des $\alpha 2$ -Adrenozeptors unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen zu beobachten, erschien als ein interessanter Aspekt für diese Studie, die sich mit dem Verhalten von Knochenmark-Makrophagen in experimenteller Arthritis beschäftigt. Auch für den $\alpha 1D$ -Adrenozeptor können unterschiedliche Wirkungsweisen unter gesunden und pathologischen Zuständen vermutet werden. In einer Studie von Roupe van der Voort et al. wurde mRNA des $\alpha 1D$ -Adrenozeptors in peripheren Blutmonozyten (PBMC) von Patienten mit juveniler RA gefunden, aber nicht in den PBMCs von gesunden Spendern, was auf eine Rolle dieses Rezeptors in der Regulation von inflammatorischen Mechanismen schließen lässt (232). Viele Studien beschäftigen sich mit der Rolle des $\beta 2$ -Adrenozeptors in Entzündungsprozessen. So wurden in einem Adjuvant-induzierten Arthritismodell Änderungen in der Expression des $\beta 2$ -AR, in der intrazellulären Signalweiterleitung sowie im Phosphorylierungsmuster nach Rezeptoraktivierung beobachtet, die abhängig vom betrachteten Immunorgan sind und unterschiedliche Effektorfunktionen in den betroffenen Zellen induzieren können (233). PACAP Rezeptor 1 wurde in die

Untersuchungen einbezogen, da er aufgrund seiner anti-inflammatorischen Wirkungsweise ein vielversprechendes Ziel für entsprechende Therapieansätze darstellt (234). Auf mRNA-Ebene konnte die Expression der muskarinergen Rezeptorsubtypen M1, M3 und M5 nachgewiesen werden, die die gleichen Signalwege induzieren, es wurde aber nur M5 für die Immunfluoreszenzfärbung ausgewählt. M3 und M5 Rezeptor-mRNA, aber nicht M1 mRNA, wird von PBMC exprimiert, wie Costa et al. herausgefunden haben (235). Interessanterweise wurden für den seltenen Subtyp M5 in verschiedenen Studien Unterschiede in der Signalweiterleitung beschrieben, die ihn besonders interessant für die vorliegende Studie machten: NIH3T3-Zellen, die mit dem Rezeptor transfiziert wurden, zeigten eine verstärkte proliferative Antwort nach Rezeptor-Agonismus (236) während die humane Melanom-Zelllinie A2058 eine reduzierte klonale Expansion zeigte, ein Effekt, der über einen alternativen Signalweg nach M5 Rezeptorstimulation vermittelt wurde (237).

Ein weiterer ACh-Rezeptor, der für die vorliegende Arbeit von Interesse war, ist die $\alpha 7$ Untereinheit des nikotinergen ACh-Rezeptors. Diese spezifische Rezeptoreinheit ist als Vermittler des sogenannten anti-inflammatorischen cholinergen Reflexes beschrieben worden, dessen Ansprechen durch den natürlichen Agonisten Acetylcholin auf der Zellmembran von Makrophagen, die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine v.a. von TNF inhibiert (182). In der Vielzahl von Versuchsansätzen dieser Arbeit konnte die mRNA für den nikotinergen $\alpha 7$ ACh-Rezeptor nur vereinzelt und sehr schwach nachgewiesen werden, auf Proteinebene war keine Expression nachweisbar.

Abbildung 4-6 zeigt, dass die AR-Subtypen $\alpha 1D$, $\alpha 2A$ und $\beta 2$, PACAP Rezeptor 1 und ACh-Rezeptor M5 von Makrophagen exprimiert werden. Da die Signalintensität des Fluoreszenzsignals nicht quantifiziert wurde, ist nur eine rein qualitative Aussage zur Expression möglich. Die dokumentierten Färbungen zeigen, dass Kollagen Typ II-induzierte Arthritis keinen Einfluss auf die Rezeptorexpression und zelluläre Lokalisierung von KMM im Vergleich zu KMM aus NaCl-behandelten Ratten hatte. Es bestehen keine Unterschiede in der Rezeptorexpression zwischen KMM aus Ratten im akuten (Abb. 4-6A) oder chronischen (Abb. 4-6B) CIA-Stadium oder einer frühen Arthritis-Phase (Daten nicht gezeigt).

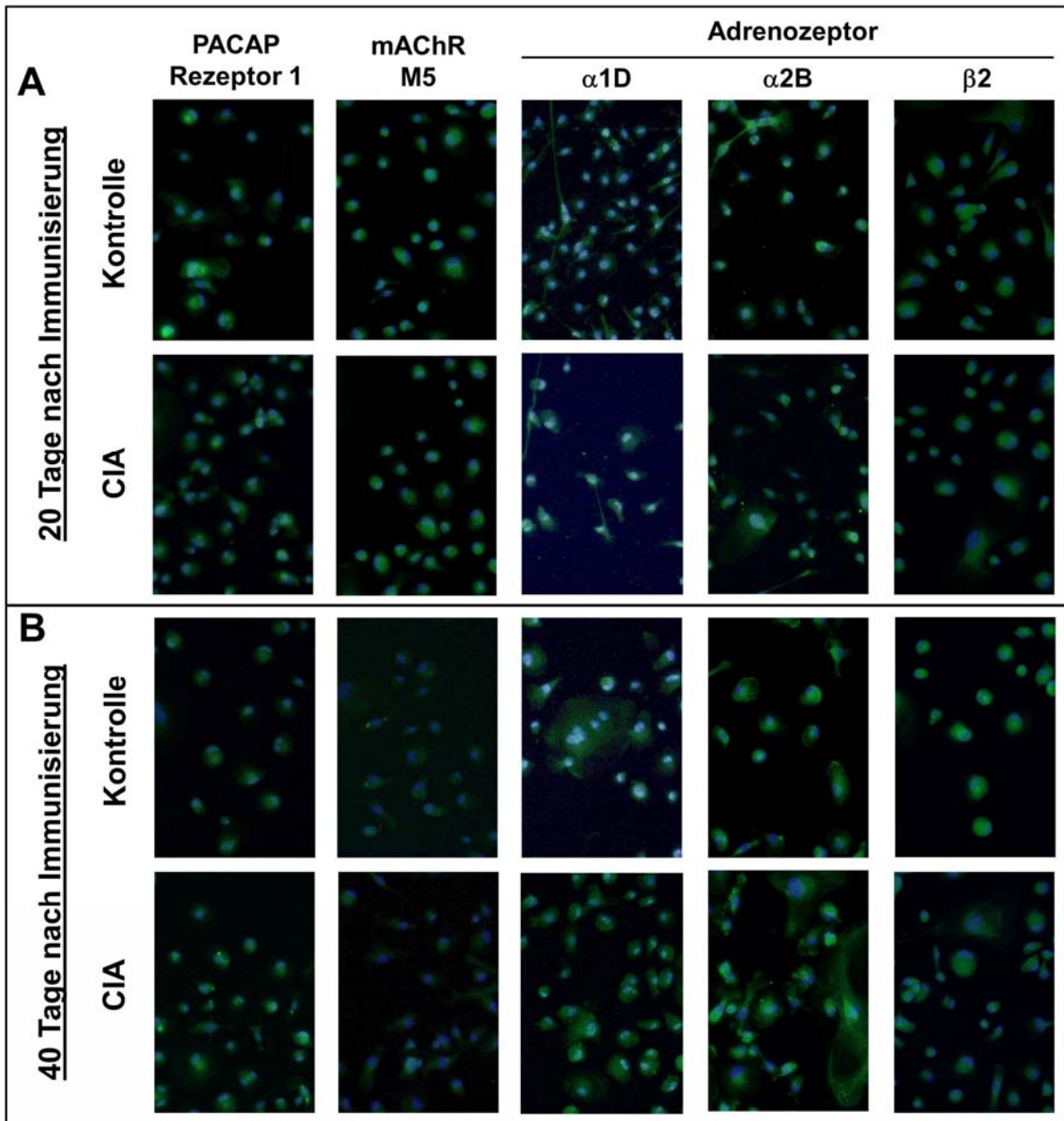


Abbildung 4-6: Neurotransmitterrezeptor-Expressionsprofil von KMM im Verlauf von CIA.

Die Adrenozeptoren $\alpha 1D$, $\alpha 2B$, $\beta 2$; der muskarinerge ACh-Rezeptor M5 und PACAP-Rezeptor 1 wurden in KMM von Kontroll- und CIA-Tieren 20 (A) und 40 (B) Tage nach Immunisierung angefärbt. Paraformaldehyd-fixierte Zellen wurden nach 5 Tagen Differenzierung mit M-CSF und RankL gefärbt und Bildausschnitte, die nur KMM (und keine Osteoklasten) enthielten wurden fotografiert. Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI.

N = 4 (Kontrolle und CIA), Vergrößerung 200x.

4.2.3 Adhäsionsverhalten an Plastikoberflächen und Komponenten der extrazellulären Matrix

Eine mögliche Ursache für die verringerte Anzahl von KMM aus dem Knochenmark akut arthritischer Ratten liegt in einer Veränderung des Adhäsionsverhaltens. Daher wurde das Adhäsionsvermögen von KMM an unbehandelte Plastikoberflächen, sowie Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen Typ I, Fibronektin und Laminin mittels Kristallviolett-Assay untersucht. Die Untersuchung der Adhäsion an unterschiedliche Matrixkomponenten kann Informationen über Unterschiede im *in vivo*-Adhäsionsverhalten von KMM aus NaCl-behandelten und arthritischen Ratten liefern.

4.2.3.1 Adhäsion an Plastikoberflächen

Abbildung 4-7A zeigt, dass CIA das Adhäsionsvermögen der KMM an Plastikoberflächen im Vergleich zu KMM aus NaCl-behandelten Ratten signifikant reduzierte. Im Zeitverlauf der Arthritis zeigte sich deutlich, dass diese Inhibition des Adhäsionsvermögens von CIA-KMM mit dem akuten Stadium der Arthritis assoziiert ist (20d, Abb. 4-7B). Der Einfluss der Neurotransmitterstimulation auf das Adhäsionsverhalten ist als prozentualer Anteil bezogen auf die jeweiligen unstimulierten Kulturen von CIA und Kontroll-KMM dargestellt. Ein Einfluss auf die Plastikadhäsion konnte nur für 10^{-8} M NA festgestellt werden, was eine erhöhte Plastikadhärenz in Kontroll-KMM induzierte (Abb. 4-7E). Im Gegensatz dazu kann bei der Betrachtung des Arthritis-Zeitverlaufs ein unterschiedlicher Einfluss der Neurotransmitter auf das Adhäsionsverhalten beobachtet werden. Signifikante Noradrenalineffekte wurden vorrangig in KMM aus Kontrolltieren beobachtet. 10^{-6} M inhibierte die Plastikadhäsion 10 Tage nach NaCl-Behandlung und 10^{-8} M erhöhte die Plastikadhäsion 40 Tage nach NaCl-Behandlung (Abb. 4-7I). Cholinerg-peptiderge Stimulation führte dagegen zu stärkeren Effekten in KMM, die aus CIA-Tieren isoliert wurden. 10^{-6} M ACh führte zu einer Inhibition der Adhäsion in CIA-KMM 15 Tage nach Immunisierung während im Gegensatz dazu, 10^{-9} M VIP 20 und 40 Tage nach Immunisierung die Adhäsion an Plastikoberflächen signifikant verstärkte (Abb. 4-7J).

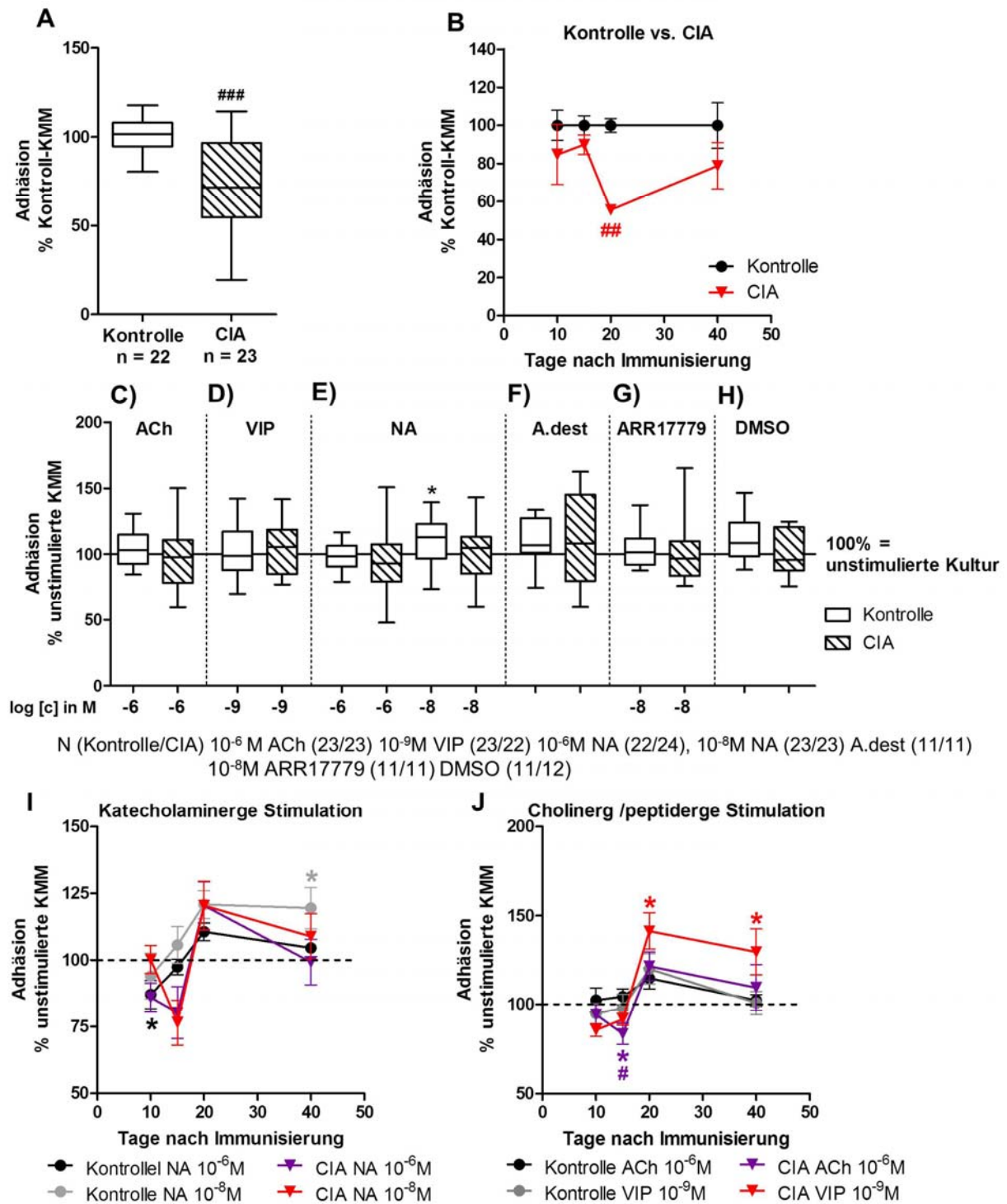


Abbildung 4-7: Adhäsion von KMM an Plastikoberflächen.

A, C-H) Die Plastik-Adhäsionskapazität von CIA-KMM ist prozentual zum Adhäsionsvermögen von Kontroll-KMM dargestellt (100%, A). Der Einfluss von ACh (C), VIP (D), NA (E), ARR17779 (G) sowie der Lösungsmittel A.dest (F) und DMSO (H) auf die Adhäsion von Kontroll- und CIA-KMM ist als prozentualer Anteil zu den jeweiligen unstimulierten Kulturen (100% = durchgezogene Linie) dargestellt.

B, I, J) B vergleicht das Adhäsionsvermögen von KMM aus immunisierten Tieren mit KMM aus NaCl-behandelten Tieren im Zeitverlauf von CIA. Der Einfluss der Stimulation mit NA (I) sowie ACh

/ VIP (J) auf das Adhäsionsverhalten von Kontroll- und CIA-KMM im Zeitverlauf von CIA ist als prozentualer Anteil zu den jeweiligen unstimulierten Kulturen (100% = gestrichelte Linie) dargestellt. N = 6 für Kontroll- und CIA-KMM und die jeweilige Neurotransmitterkonzentration zu jedem Zeitpunkt. Boxplots umfassen das 10te bis 90te Perzentil der Datensätze. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. ^{##}p<0,01 ^{###}p<0,001 Kontrolle vs. CIA. *p<0,05 Stimulation vs. unstimuliert.

4.2.3.2 Adhäsion an Kollagen Typ I, Fibronectin und Laminin und Integrinexpression

Um zu überprüfen, ob die Veränderung des Adhäsionsverhaltens in der akuten CIA-Phase auch andere Substrate, wie beispielsweise Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM), betrifft, wurden Adhäsionsversuche auf Zellkulturplatten, die mit Kollagen Typ I, Fibronectin oder Laminin beschichtet waren, durchgeführt. Für die Untersuchungen wurde zum einen der Zeitpunkt des akuten Arthritis-Stadiums, an dem die größten Veränderungen im Adhäsionsverhalten auf Plastik beobachtet wurden, und das chronische Stadium, 40 Tage nach Immunisierung, gewählt, für das kein Einfluss von CIA auf das Plastik-Adhäsionsverhalten beobachtet wurde.

Die Adhäsion von KMM aus akut arthritischen Ratten an Kollagen Typ I war tendenziell reduziert im Vergleich zu KMM aus Kontrolltieren 20 Tage nach NaCl-Behandlung. Durch Erreichen der chronischen CIA-Phase wurde der Effekt signifikant verstärkt und die Adhäsion an Kollagen Typ I war um circa 50% niedriger als die Adhäsion von Kontroll-KMM (Abb. 4-8A). Die Untersuchung des Neurotransmittereinflusses auf die Adhäsion an Kollagen Typ I offenbarte nur geringe signifikante Effekte (Abb. 4-8D). Die Stimulationseffekte sind als prozentualer Anteil zu den entsprechenden unstimulierten KMM-Kulturen von NaCl-behandelten und arthritischen Ratten dargestellt. Stimulation mit 10^{-6} M NA inhibierte die Adhäsion an Kollagen Typ I 40 Tage nach Immunisierung. Eine ähnliche Tendenz konnte für 10^{-6} M NA auch 20 Tage nach Immunisierung und 20 Tage nach NaCl-Behandlung beobachtet werden. VIP hemmte die Adhäsion von Kontroll-KMM an Kollagen I tendenziell 20 (p=0,0625) und 40 Tage nach NaCl-Behandlung (Abb. 4-8D).

Die Adhäsion an Fibronectin wurde durch CIA gegenüber den Kontroll-KMM 40 Tage nach Immunisierung signifikant reduziert (Abb. 4-8B). Es waren nur geringe Neurotransmittereffekte zu beobachten, wobei Stimulation mit 10^{-6} M NA tendenziell zu einer Inhibition der Adhäsion an Fibronectin 20 Tage nach Immunisierung und NaCl-Behandlung führte (Abb. 4-8E).

Der Einfluss von CIA auf die Adhäsion an Laminin war vergleichsweise gering verglichen mit den Effekten, die für Kollagen Typ I und Fibronectin beobachtet wurden (Abb. 4-8C).

Stimulation mit dem Neuropeptid VIP verringerte tendenziell die Adhäsion von KMM an Laminin, die 40 Tage nach NaCl-Behandlung isoliert wurden (Abb. 4-8F). Ähnliches konnte auch für 10^{-6} M NA beobachtet werden, das 40 Tage nach Kontrollbehandlung in den KMM der NaCl-behandelten Tiere eine reduzierte Adhäsion an Laminin verursachte.

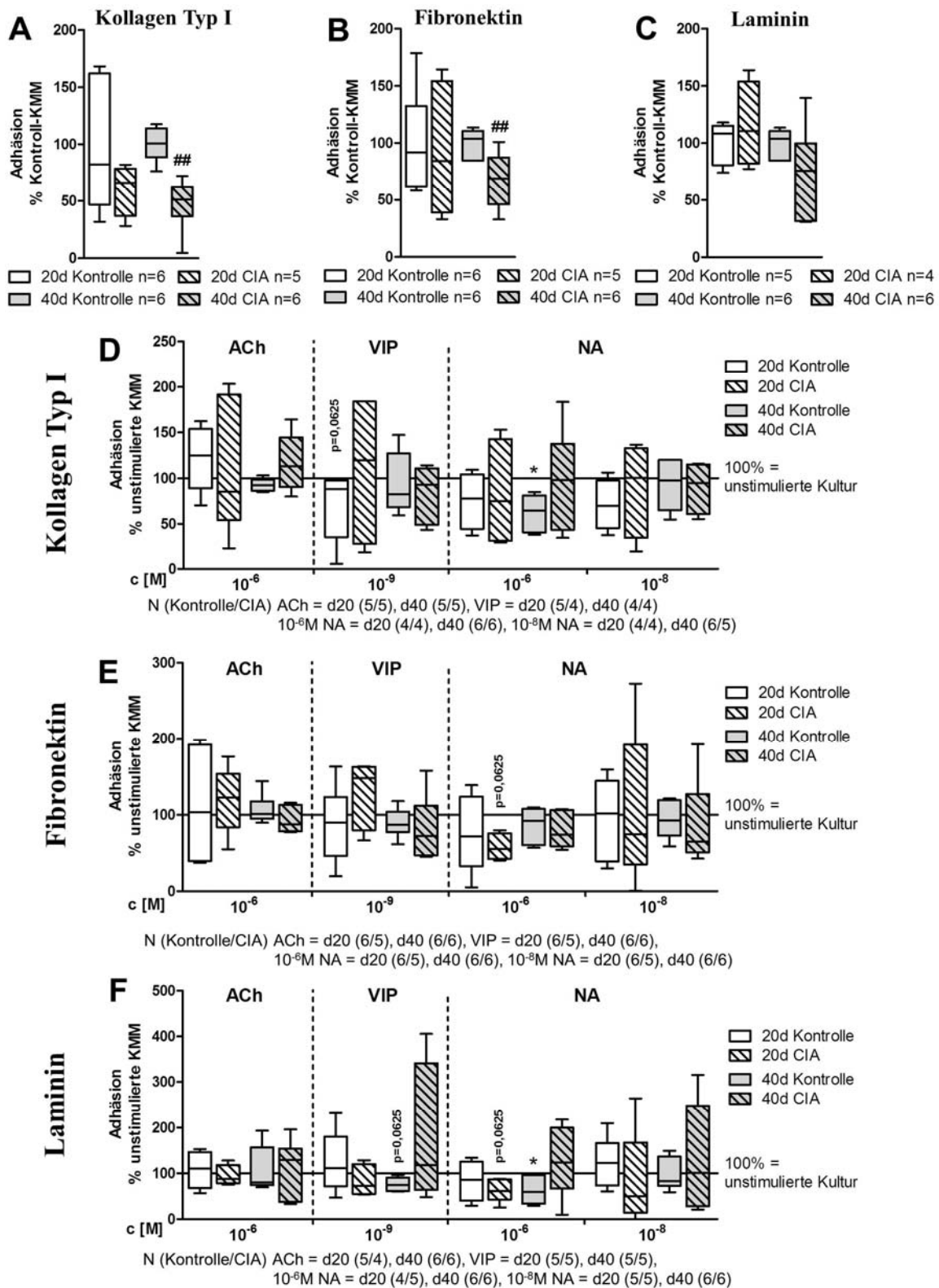


Abbildung 4-8: Adhäsion von KMM an Komponenten der extrazellulären Matrix.

A, B, C) Das Adhäsionsverhalten von CIA-KMM an Kollagen I (A), Fibronektin (B) und Laminin (C) wurde mit dem von Kontroll-KMM 20 und 40 Tage nach Immunisierung verglichen. Daten der Kontroll-KMM wurden 100% gesetzt und die Werte der CIA-KMM prozentual darauf bezogen. D-F) Der Einfluss der Neurotransmitter ACh, VIP und NA auf die Adhäsion an die EZM-Bestandteile ist

als prozentualer Anteil zu den entsprechenden unstimulierten Kulturen von CIA- und Kontroll-KMM dargestellt (100% = durchgezogene Linie). Ergebnisse für Kollagen Typ I sind unter (D), für Fibronectin unter (E) und entsprechende Ergebnisse für Laminin unter (F) dargestellt.

Die Box-Plots zeigen den Median und den Interquartilsabstand der Werte, die Whisker umfassen Minimum und Maximum der Werte.

* $p < 0,5$ Stimulation vs. unstimuliert; ## $p < 0,01$ Kontrolle vs. CIA.

Um einen Anhaltspunkt zu erhalten, was die Ursache für die beobachtete Veränderung im Adhäsionsvermögen an Kollagen Typ I und Fibronectin sein könnte, wurde die Expression der Integrine CD29 (Integrin $\beta 1$) und CD51/CD61 (Integrin $\alpha v \beta 3$) auf den Knochenmark-Makrophagen NaCl-behandelter und arthritischer Ratten mittels Durchflusszytometrie untersucht.

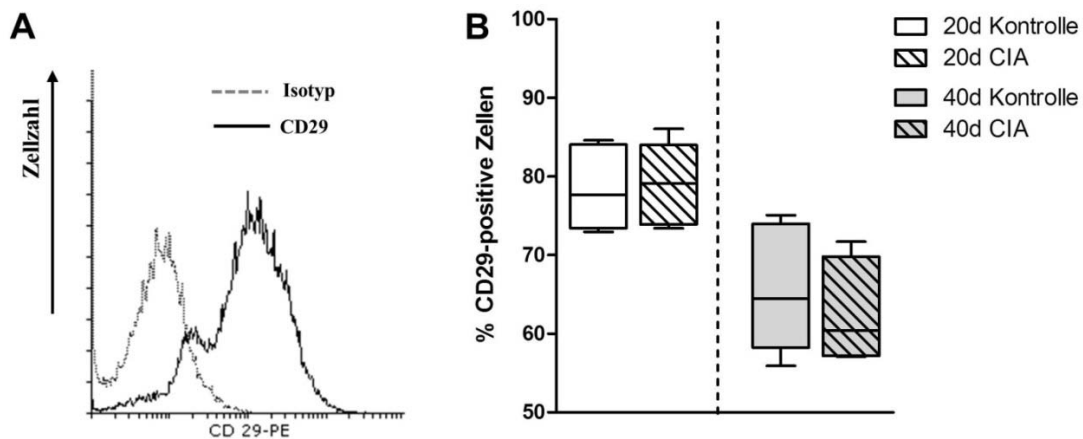


Abbildung 4-9: CD29-Expression auf KMM.

A Integrin CD29 wird von KMM auf ihrer Oberfläche exprimiert. B Vergleich der Anteile CD29-positiver KMM aus Ratten mit Kollagen Typ II-induzierter Arthritis und NaCl-behandelten Kontrolltieren 20 und 40 Tage nach Immunisierung bzw. Behandlung.

N = 6 für Kontrolle und CIA pro Zeitpunkt. Die Box-Plots zeigen den Median und den Interquartilsabstand der Werte, die Whisker umfassen Minimum und Maximum der Werte.

Sowohl die KMM arthritischer Tiere, als auch die NaCl-behandelter Tiere, exprimierten CD29 und es konnte kein Einfluss von CIA auf den prozentualen Anteil der CD29-positiven Zellen 20 oder 40 Tage nach Immunisierung festgestellt werden (Abb. 4-9). Der verwendete Antikörper erlaubt keine Aussage über den Aktivierungsstatus von CD29, sondern erfasst sowohl inaktive als auch aktivierte Zustände. Die Expression von Integrin CD51/CD61 konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2.4 Proliferation von Knochenmark-Makrophagen

Ein weiterer Faktor, der eine reduzierte Anzahl von Knochenmark-Makrophagen verursachen könnte, ist eine Reduktion in der Proliferationskapazität durch CIA-induzierte Prozesse. Mittels BrdU Proliferationsassay wurde daher das Proliferationsvermögen von KMM, die aus arthritischen Ratten isoliert wurden, mit dem Proliferationsverhalten von KMM aus NaCl-behandelten Ratten verglichen, sowie der Einfluss der Neurotransmitter ACh, NA und VIP untersucht.

Durch CIA wurde die Proliferationskapazität von Knochenmark-Makrophagen, verglichen mit KMM aus NaCl-behandelten Ratten, um etwa 25% reduziert (Abb. 4-10A). Betrachtet man den Zeitverlauf der CIA, so wird deutlich, dass mit dem Auftreten erster Krankheitssymptome und in der chronischen Phase, die Proliferation der KMM aus arthritischen Tieren stark verringert war, während in der akuten Phase kein Unterschied in der Proliferationskapazität zu KMM aus NaCl-behandelten Tieren bestand (Abb. 4-10B). Um zu untersuchen, welche Zellzyklusphase der Proliferation durch CIA beeinträchtigt wird, wurde mittels Durchflusszytometrie die Verteilung der KMM aus NaCl-behandelten und arthritischen Tieren in den Zellzyklusphasen G₀/G₁-, S-, und G₂/M-Phase untersucht. Es konnte kein Unterschied in der Verteilung der KMM in den verschiedenen Zellzyklusphasen zwischen KMM aus arthritischen Tieren und NaCl-behandelten Tieren festgestellt werden (Abb. 4-11).

Des Weiteren wurde der Einfluss der Neurotransmitter ACh und NA, sowie des Neuropeptids VIP und des nikotinergeren $\alpha 7$ Rezeptoragonisten ARR17779 auf die Proliferation von KMM NaCl-behandelter und arthritischer Ratten untersucht. Die Ergebnisse sind als prozentuale Anteile zu den jeweiligen unstimulierten Kulturen von KMM aus NaCl-behandelten und arthritischen Ratten dargestellt. Cholinerg / peptiderge Rezeptorstimulation mittels 10^{-6} M ACh und 10^{-9} M VIP ($p=0,0735$) reduzierte die Proliferation von KMM aus immunisierten Tieren im Vergleich zu den unstimulierten KMM, während Kontroll-KMM unbeeinflusst blieben (Abb. 4-10C, D). Im Zeitverlauf der Arthritis konnte man dagegen einen signifikanten Anstieg der Proliferation in Kontroll-KMM durch ACh und VIP 20 Tage nach NaCl-Behandlung erkennen. Dementgegen stand die signifikante Hemmung der Proliferation durch ACh und VIP in zeitgleich aus immunisierten Tieren isolierten KMM (Abb. 4-10I). In KMM, die 40 Tage nach NaCl-Behandlung isoliert wurden, bewirkten ACh und VIP in Relation zu den unstimulierten Kulturen eine Hemmung der Proliferation. In KMM aus chronisch-arthritischen Ratten konnte die Hemmung nur nach Stimulation mit ACh beobachtet werden.

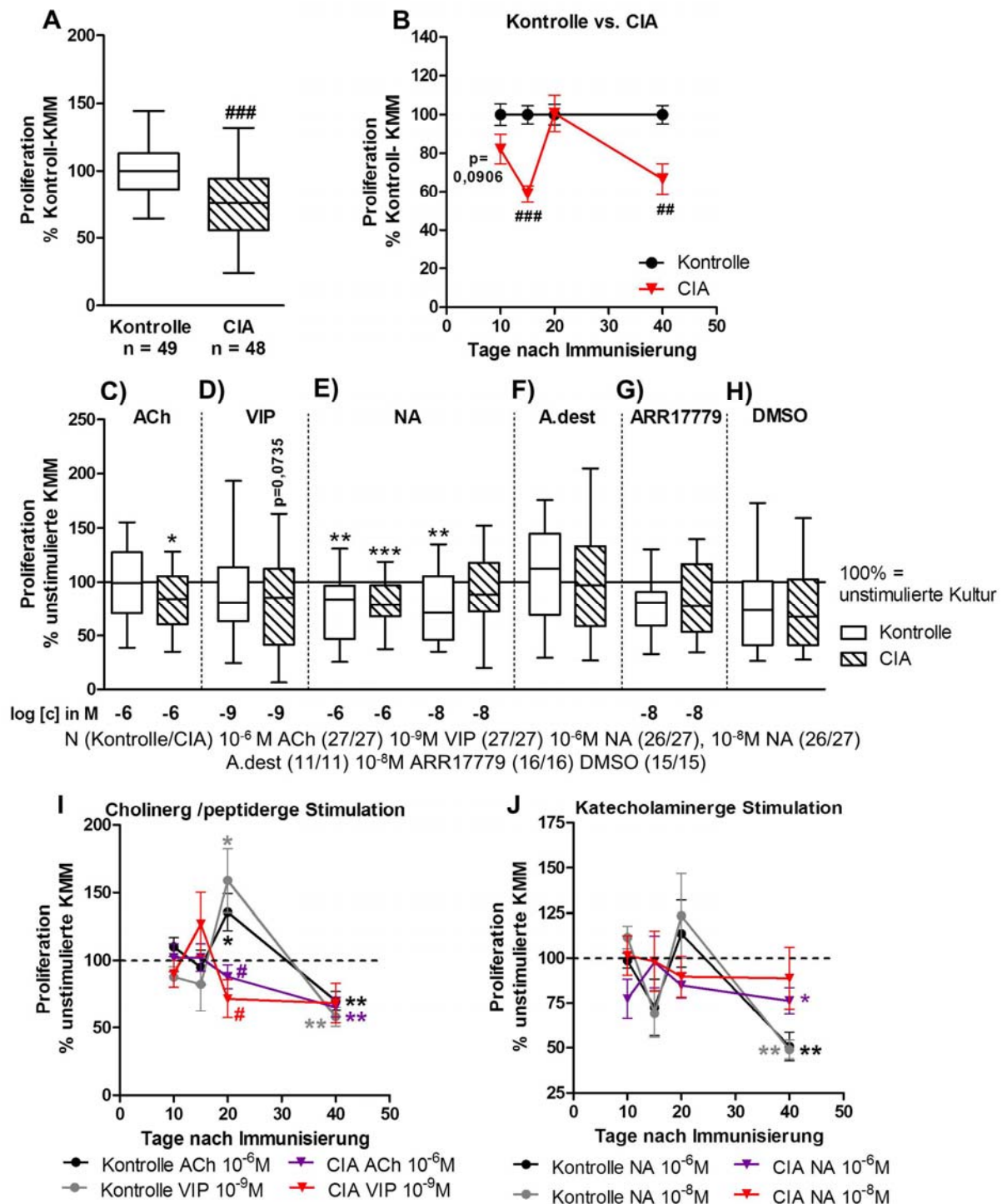


Abbildung 4-10: Proliferationsanalyse von KMM.

A, C-H) A zeigt die Proliferation von CIA-KMM prozentual zur Proliferation von Kontroll-KMM (100%). Der Einfluss von ACh (C), VIP (D), NA (E), ARR17779 (G) sowie der Lösungsmittel A_{dest} (F) und DMSO (H) ist als prozentualer Anteil zu den jeweiligen unstimulierten Kulturen (100% = durchgezogene Linie) dargestellt.

B, I, J) B Proliferation der KMM aus immunisierten Tieren in Relation zu KMM aus NaCl-behandelten Tieren im Zeitverlauf der CIA. Der Einfluss der Stimulation mit NA (J) sowie ACh / VIP (I) im Zeitverlauf von CIA ist als prozentualer Anteil zu den jeweiligen unstimulierten Kulturen (100% = gestrichelte Linie) dargestellt.

N (Kontrolle/CIA) = d10 (11/12), d15 (12/12), d20 (12/12), d40 (14/14)

Neurotransmitterstimulation N (Kontrolle/CIA) = d10 (6/6), d15 (6/6), d20 (8/8), d40 (8/8) für ACh, VIP und NA (10^{-6} M, 10^{-8} M). Die Box-Plots zeigen den Median und den Interquartilsabstand der Werte, die Whisker umfassen Minimum und Maximum der Werte. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. $^{###}p<0,01$ $^{####}p<0,001$ Kontrolle vs. CIA. $^{*}p<0,05$, $^{**}p<0,01$, $^{***}p<0,001$ Stimulation vs. unstimuliert.

Noradrenerge Rezeptorstimulation bewirkte ebenfalls eine Hemmung der Proliferation verglichen mit den jeweiligen unstimulierten Kulturen, dabei wirkte 10^{-6} M NA auf KMM aus Kontrollen und CIA-Ratten und 10^{-8} M nur auf KMM aus Kontrollen (Abb. 4-10E). Im Zeitverlauf der Arthritis konnten diese Effekte eindeutig den Zeitpunkten 40 Tage nach NaCl-Behandlung respektive nach Immunisierung zugeordnet werden (Abb. 4-10J).

Der proliferationshemmende Effekt des Agonisten des nikotinergen $\alpha 7$ ACh-Rezeptors, ARR17779, konnte eindeutig auf Effekte des genutzten Lösungsmittels DMSO zurückgeführt werden, das ebenfalls proliferationshemmend wirkte (Abb. 4-10G, H).

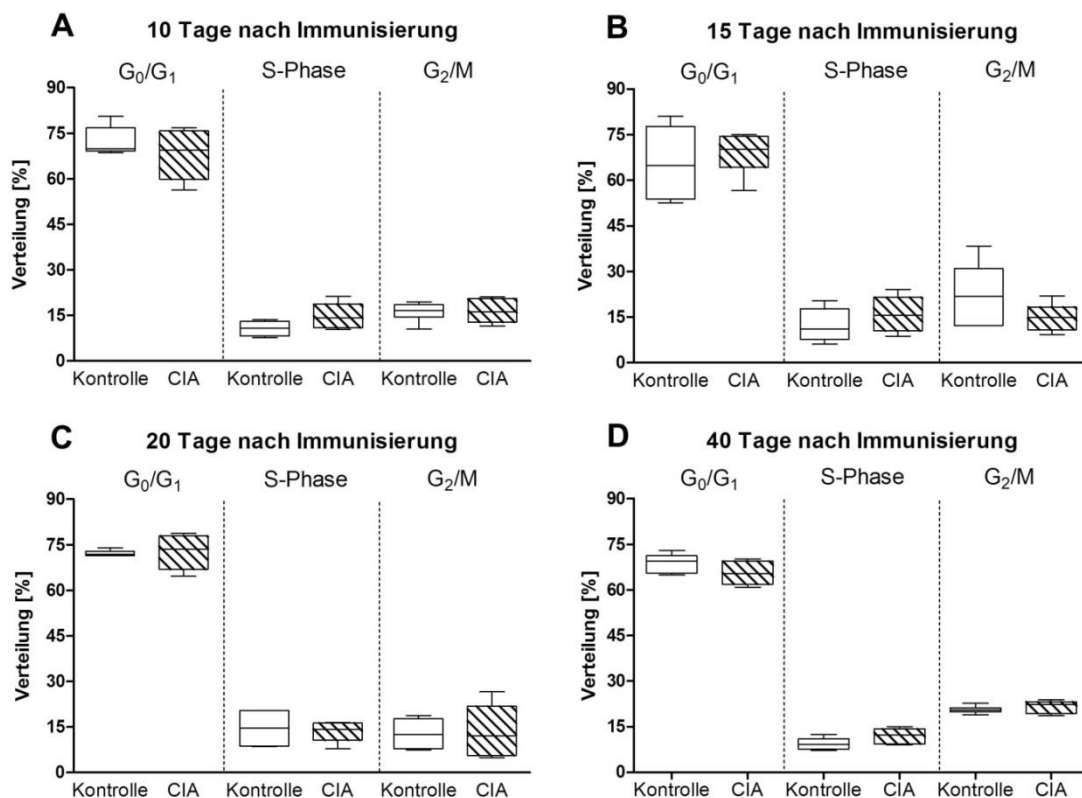


Abbildung 4-11: Zellzyklusanalyse.

Verteilung der KMM arthritischer und NaCl-behandelter Ratten in den Zellzyklusphasen G₀/G₁, S und G₂/M 10 (A), 15 (B), 20 (C) und 40 (D) Tage nach Immunisierung.

N = 6 für Kontrolle und CIA pro Zeitpunkt. Die Box-Plots zeigen den Median und den Interquartilsabstand der Werte, die Whisker umfassen Minimum und Maximum der Werte.

4.2.5 Caspase 3/7 Aktivität von Knochenmark-Makrophagen

Ein Faktor der ebenfalls die Anzahl der KMM beeinflussen kann, ist eine Veränderung des Apoptoseverhaltens. Daher wurde die Caspase 3/7-Aktivität der KMM aus arthritischen und NaCl-behandelten Ratten untersucht.

Es konnte kein Unterschied in der Caspase 3/7 Aktivität von KMM aus immunisierten und NaCl-behandelten Tieren festgestellt werden (Abb. 4-12A, B).

Um den Einfluss der sympathischen Neurotransmitter NA, ACh und VIP sowie des Agonisten des nikotinergen $\alpha 7$ ACh-Rezeptors, ARR17779, auf die Caspase 3/7-Aktivität von KMM darzustellen, wurde der jeweilige Effekt als prozentualer Bezug zur entsprechenden unstimulierten KMM-Kultur von Kontrollen und CIA-Ratten berechnet.

Einzig Stimulation mit 10^{-8} M NA führte zu einer reduzierten Caspase 3/7-Aktivität in KMM aus immunisierten Tieren verglichen mit den unstimulierten KMM (Abb. 4-12E). Betrachtet man den Einfluss der verschiedenen Neurotransmitter im Zeitverlauf nach Immunisierung oder NaCl-Behandlung, lassen sich starke gegensätzliche Stimulationseffekte 15 Tage nach der jeweiligen Behandlung erkennen. 10^{-6} und 10^{-8} M NA führen zu einer signifikant verstärkten Caspase 3/7-Aktivität in den KMM aus Kontrolltieren während die Caspase 3/7-Aktivität der KMM aus immunisierten Tieren demgegenüber signifikant reduziert war (Abb. 4-12J). Weitere NA-Effekte waren im Zeitverlauf der CIA nicht erkennbar.

ACh und VIP erhöhten ebenfalls die Caspase 3/7-Aktivität in den KMM aus Kontrolltieren 15 Tage nach NaCl-Behandlung, der Effekt wurde aber aufgrund der geringen n-Zahl ($n=3$) und der hohen Streuung nicht signifikant. Im direkten Vergleich der Effekte von ACh und VIP zwischen Kontrollen und CIA, war die Caspase 3/7-Aktivität der CIA-KMM signifikant niedriger im Vergleich zu den KMM der Kontrollen (Abb. 4-12I). Zusätzlich wurde durch 10^{-9} M VIP die Caspase 3/7-Aktivität in KMM, die 20 Tage nach Kontrollbehandlung aus DA Ratten isoliert wurden, im Vergleich zu den entsprechenden unstimulierten KMM-Kulturen, signifikant inhibiert.

Analog zum Adhäsions- und Proliferationsassay, konnten für ARR17779 keine spezifischen Effekte auf die Caspase 3/7-Aktivität von KMM aus immunisierten oder Kontrolltieren festgestellt werden, da das verwendete Lösungsmittel DMSO in den KMM-Kulturen gleiche Effekte hervorrief (Abb. 4-12G, H).

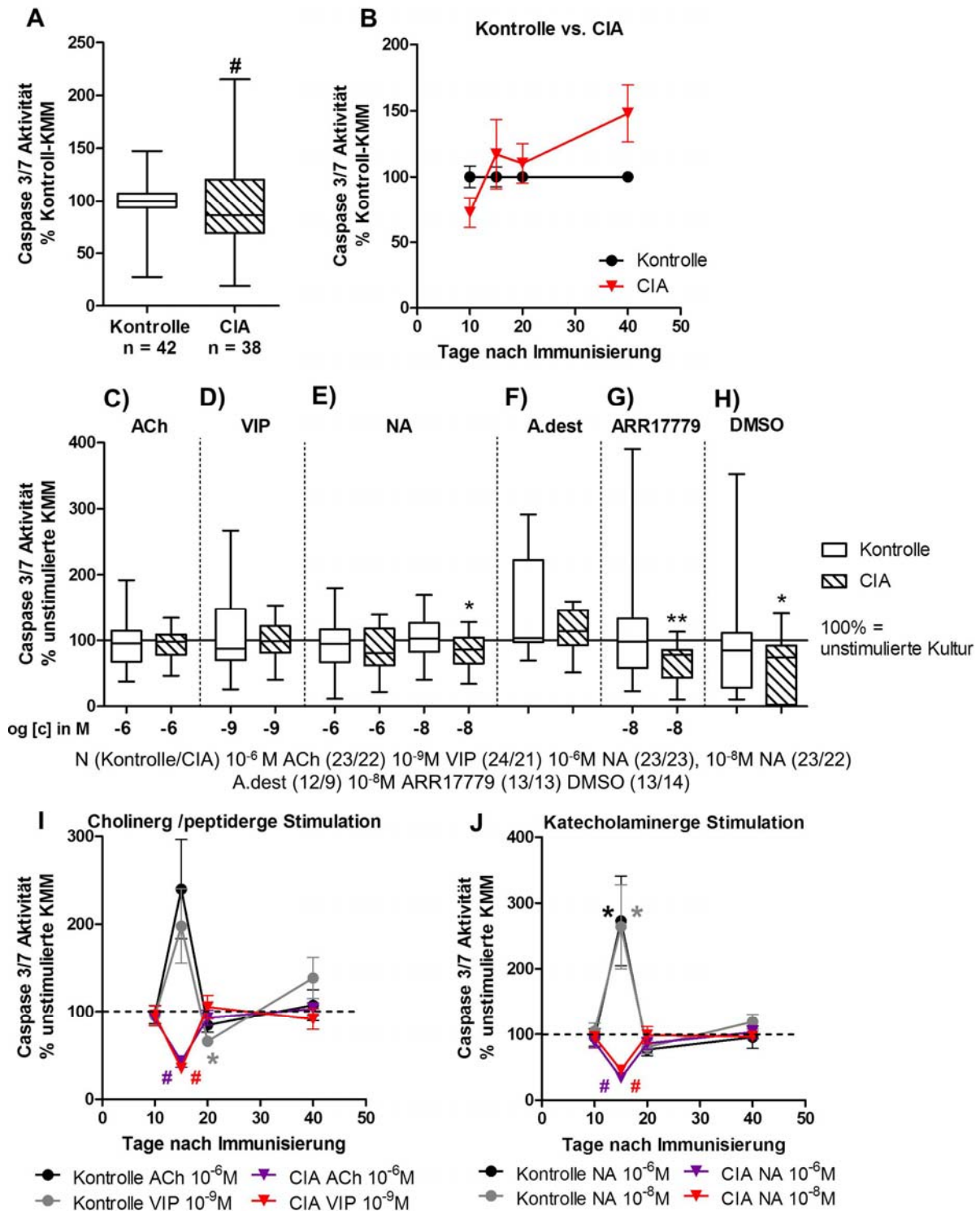


Abbildung 4-12: Caspase 3/7 Assay von KMM.

A, C-H) Vergleich der Caspase 3/7-Aktivität von CIA-KMM prozentual zur Caspase 3/7-Aktivität von Kontroll-KMM (100%, A). Der Einfluss der Stimulation mit ACh (C), VIP (D), NA (E), ARR17779 (G) und der Lösungsmittel A.dest (F) und DMSO (H) ist als prozentualer Anteil zu den jeweiligen unstimulierten Kulturen (100% = durchgezogene Linie) dargestellt.

B, I, J) B vergleicht die Caspase 3/7-Aktivität von KMM aus immunisierten Tieren mit KMM aus NaCl-behandelten Tieren im Zeitverlauf von CIA. Der Einfluss der Stimulation mit ACh / VIP (I) sowie NA (J) auf die Caspase 3/7-Aktivität von Kontroll- und CIA-KMM im Zeitverlauf der CIA ist

als prozentualer Anteil zu den jeweiligen unstimulierten Kulturen (100% = gestrichelte Linie) dargestellt.

N (Kontrolle/CIA) = d10 (9/10), d15 (12/9), d20 (10/10), d40 (11/12)

Neurotransmitterstimulation N (Kontrolle/CIA) = d10 (6/6), d15 (6/3), d20 (6/6), d40 (8/8) für ACh, VIP und NA (10^{-6} M, 10^{-8} M)

Die Box-Plots zeigen den Median und den Interquartilsabstand der Werte, die Whisker umfassen Minimum und Maximum der Werte. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. #p<0,05 Kontrolle vs. CIA. *p<0,05, **p<0,01 Stimulation vs. unstimuliert.

4.3 Untersuchungen zur Osteoklastogenese von Knochenmark-Makrophagen

4.3.1 Osteoklasten exprimieren Rezeptoren für Acetylcholin, Noradrenalin und vasoaktives intestinales Peptid

Da der Einfluss der Neurotransmitter ACh, NA und VIP auf die Osteoklastogenese von Knochenmark-Makrophagen aus NaCl-behandelten und arthritischen Tieren untersucht werden sollte, wurde initial die Expression einer Vielzahl von Rezeptoren für diese Neurotransmitter auf mRNA- und Proteinebene analysiert. Mittels quantitativer real-time PCR wurde die mRNA-Expression von VIP-Rezeptor 1 und 2, PACAP-Rezeptor 1, den muskarinergen ACh-Rezeptoren M3 und M5 sowie der Adrenozeptoren α 1D, α 2A, α 2B und β 2 untersucht (Abb. 4-13).

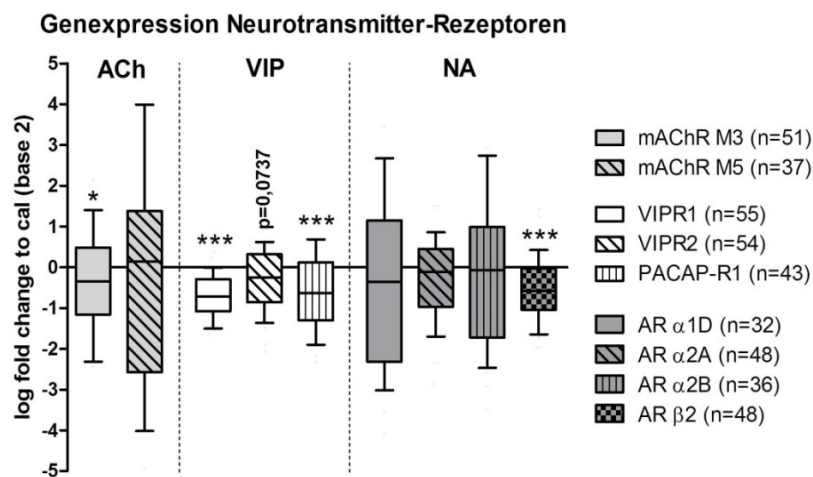


Abbildung 4-13: Relative Genexpressionsanalyse von Rezeptoren für ACh, NA und VIP.

Genexpressionsdaten von Neurotransmitterrezeptoren für ACh, VIP und NA von Osteoklasten, die aus KMM arthritischer Tiere generiert wurden, relativ zu Expression von Osteoklasten aus den KMM NaCl-behandelter Ratten dargestellt (Null-Linie). Die Expression der Rezeptor-mRNA wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert und als *log fold change* zum Kalibrator (Basis 2) dargestellt. Boxplots umfassen das 10te bis 90te Perzentil der Datensätze. *p<0,05; ***p<0,001.

Osteoklasten, die nach Induktion von CIA aus den KMM immunisierter Tiere differenziert wurden, zeigten eine signifikante Herunterregulierung der mRNA-Expression von ACh-

Rezeptor M3, VIP-Rezeptor 1 und PACAP-Rezeptor 1 und des Adrenozeptors $\beta 2$ bezogen auf die Expression von Osteoklasten NaCl-behandelter Ratten (Abb. 4-13). Tabelle 4-1 zeigt die Genexpressionsdaten der Neurotransmitterrezeptoren im Zeitverlauf der CIA. Man sieht deutlich, dass VIP-Rezeptor 1 in allen Arthritisphasen signifikant herunterreguliert war, während die Genexpression von VIP-Rezeptor 2 nur 10 Tage nach Immunisierung und von PACAP-Rezeptor 1 ab Tag 15 nach Immunisierung bis in die chronische Phase signifikant reduziert war. Im Zeitverlauf der Arthritis konnten zusätzlich CIA-Einflüsse auf die Expression von ACh-Rezeptor M5, Adrenozeptor $\alpha 1D$ und $\alpha 2B$ sowie VIP-Rezeptor 2 festgestellt werden, die in der Summe der CIA-Effekte nicht sichtbar wurden. Vor allem die Expression des M5 ACh-Rezeptor wurde durch CIA reguliert, mit einer starken Hemmung der Genexpression 10 Tage nach Immunisierung (-3,5) und der stärksten Induktion 20 Tage nach Immunisierung (+2,75).

	10 Tage n. I.	15 Tage n. I.	20 Tage n. I.	40 Tage n. I.
VIP Rezeptor1 (n=13-15)	***-1,13±0,17	***-0,91±0,13	***-0,53±0,09	***-0,56±0,12
VIP Rezeptor2 (n=13-15)	**0,86±0,26	-0,11±0,17	0,31±0,31	-0,27±0,16
PACAP Rezeptor1 (n=8-14)	-0,95±0,58	*-0,80±0,29	**0,46±0,14	**0,72±0,24
AR $\alpha 1D$ (n=5-10)	-1,92±0,72	-0,06±0,78	*0,96±0,37	-0,83±0,59
AR $\alpha 2A$ (n=10-13)	-0,54±0,41	-0,39±0,32	-0,20±0,28	0,02±0,16
AR $\alpha 2B$ (n=5-11)	*-1,42±0,48	0,25±0,72	0,92±0,28	-0,94±0,42
AR $\beta 2$ (n=10-13)	**1,07±0,15	**0,86±0,19	**0,36±0,27	*-0,31±0,11
mAChR M3 (n=10-15)	*-0,70±0,33	-0,60±0,37	*0,59±0,26	**0,92±0,28
mAChR M5 (n=5-13)	*-3,51±0,73	0,68±0,83	**2,75±0,85	*-1,41±0,58

Tabelle 4-1: Genexpression der Neurotransmitterrezeptoren in Zeitverlauf von CIA.

Die Tabelle zeigt die Genexpressionsdaten der Neurotransmitterrezeptoren von Osteoklasten, die aus KMM arthritischer Tiere generiert wurden sind relativ zu Expression von Osteoklasten aus den KMM NaCl-behandelter Ratten im Zeitverlauf der CIA. Die Expression der Rezeptor-mRNA wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert und als Mittelwert \pm SEM des *log fold change* zum Kalibrator (Basis 2) dargestellt. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. AR – Adrenozeptor, mAChR – muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor, n.I. – nach Immunisierung

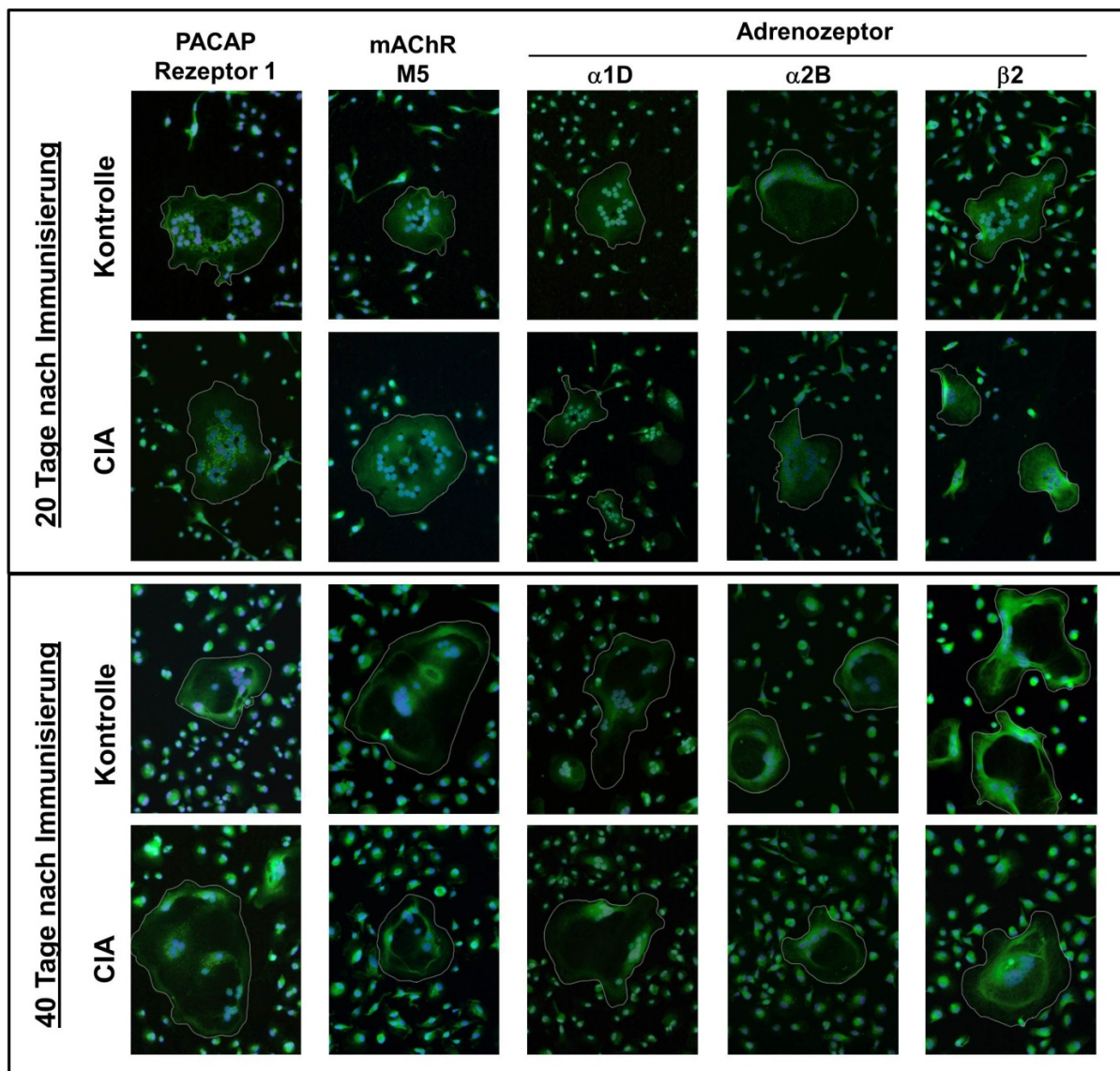


Abbildung 4-14: Neurotransmitterrezeptor-Expressionsprofil von Osteoklasten im Verlauf von CIA.

Nachweis der Adrenozeptoren $\alpha 1D$, $\alpha 2B$, $\beta 2$; des muskarinergen ACh-Rezeptors M5 und des PACAP-Rezeptors 1 mittels Immunfluoreszenzfärbung in Osteoklasten, die aus den KMM immunisierter und NaCl-behandelter Ratten 20 und 40 Tage nach der jeweiligen Behandlung isoliert wurden. Zellen mit drei und mehr Zellkernen werden als Osteoklasten bezeichnet (weiß umrandet). DAPI-Zellkernfärbung.

N = 4 (Kontrolle und CIA), Vergrößerung 200x.

Um zu überprüfen, ob die durch CIA induzierten Veränderungen in der Genexpression auch auf Proteinebene detektierbar waren, wurden die Adrenozeptoren $\alpha 1D$, $\alpha 2B$ und $\beta 2$, ACh-Rezeptor M5 sowie PACAP-Rezeptor 1 mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Die Färbung stellt eine rein qualitative Aussage zu der Proteinexpression der Rezeptoren dar, da keine weitere Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte. Abbildung 4-14 zeigt die Rezeptorfärbung von Osteoklasten arthritischer Ratten 20 und 40 Tage nach Immunisierung

im Vergleich zu Osteoklastenkulturen der jeweiligen NaCl-behandelten Kontrollen. Es ist kein offensichtlicher Unterschied in der Intensität der Immunfluoreszenz zu beobachten und auch in der zellulären Lokalisation der Rezeptoren ist kein Einfluss von CIA zu erkennen. Neben den oben erwähnten Rezeptoren wurde auch die Expression der $\alpha 7$ Untereinheit des nikotineren ACh-Rezeptors untersucht, da diesem große Relevanz als Vermittler des anti-inflammatorischen cholinergen Reflexes zugeschrieben wird. Allerdings konnte die Rezeptoruntereinheit nur selten und sehr schwach auf mRNA-Ebene detektiert werden und auch auf Proteinebene konnte der Rezeptor nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.3.2 Osteoklastogene Differenzierungskapazität von Knochenmark-Makrophagen

4.3.2.1 Osteoklastenanzahl

Um zu untersuchen, ob die osteoklastogene Differenzierungskapazität von KMM durch Kollagen Typ II-induzierte Arthritis beeinträchtigt wird, wurden KMM aus dem Knochenmark arthritischer und NaCl-behandelter Tiere isoliert und 5 Tage in Osteoklasten-Medium mit M-CSF und RankL differenziert und die Anzahl der entstandenen Osteoklasten ausgezählt. Als Osteoklasten wurden Zellen mit 3 und mehr Zellkernen gezählt. Vorversuche in denen die Osteoklastenanzahl nach 3, 4 und 5 Tagen Differenzierung bestimmt wurde, hatten ergeben, dass die Anzahl nach 5 Tagen am höchsten war.

In Abbildung 4-15A ist der Einfluss von CIA auf die Osteoklastogenese dargestellt. Die Darstellung zeigt den prozentualen Anteil der Osteoklastenanzahl arthritischer Tiere in Relation zur Osteoklastenanzahl NaCl-behandelter Tiere nach 5 Tagen Differenzierung (100%). Die osteoklastogene Differenzierung von KMM zu Osteoklasten wird durch CIA nicht beeinflusst und auch in den unterschiedlichen Arthritis-Stadien war kein deutlich messbarer Unterschied festzustellen (Abb. 4-15B). Die gleichzeitige Genexpressionsanalyse von Differenzierungsmarkern wie dem Transkriptionsfaktor NFATc1 oder den Rezeptoren für M-CSF und RankL, sowie dem späten Differenzierungsmarker für reife Osteoklasten, dem Calcitonin-Rezeptor, zeigte eine signifikante Verringerung der Genexpression in den Osteoklasten, die aus den KMM arthritischer Tiere differenziert wurden (Abb. 4-15C). Tabelle 4-2 zeigt, dass der hemmende Einfluss von CIA auf die Osteoklastenmarker im Zeitverlauf von CIA vor allem in den frühen Phasen, 10 und 15 Tage nach Immunisierung, auftrat. Nur für NFATc1 und den Rank-Rezeptor konnte eine Reduktion der Genexpression auch in der chronischen CIA-Phase nachgewiesen werden. Die CIA-induzierte Inhibition der

Genexpression der Differenzierungsmarker führte aber nicht zu einer Inhibition der Osteoklastogenese der CIA-KMM.

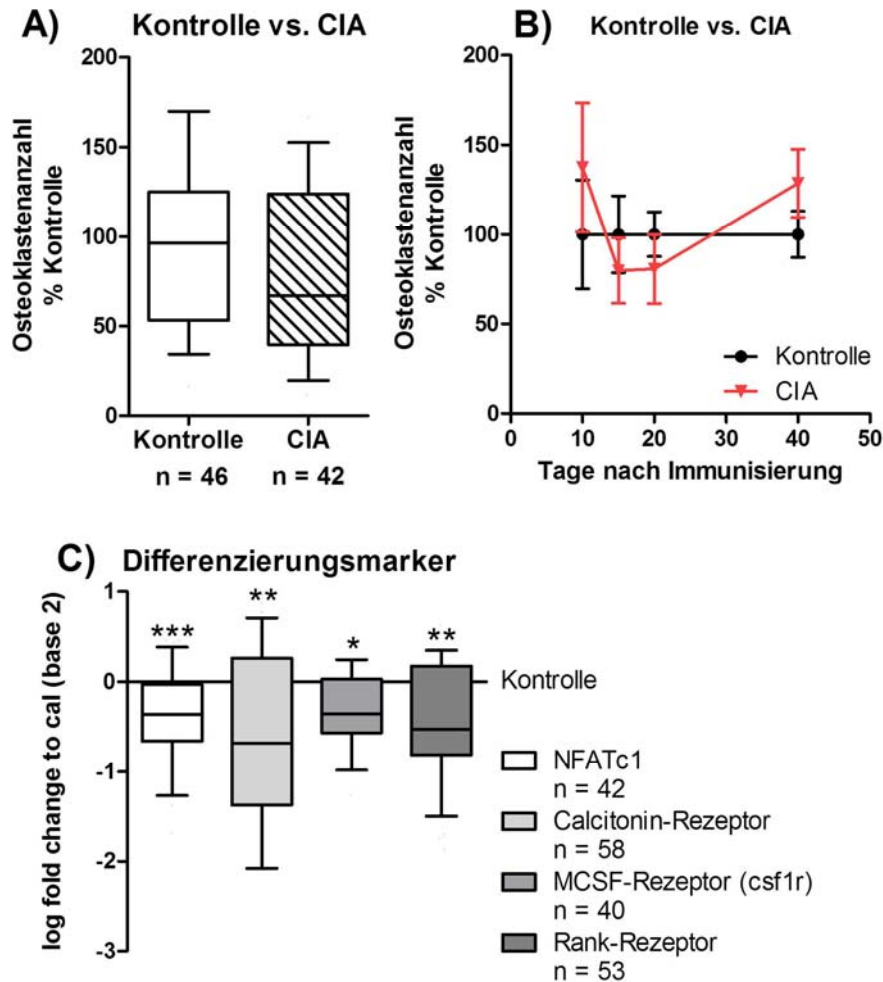


Abbildung 4-15: Einfluss von CIA auf Osteoklastenanzahl und Genexpression von Differenzierungsmarkern.

A stellt die Osteoklastenanzahl, die aus CIA-KMM generiert wurde, prozentual zur Osteoklastenanzahl, die aus den KMM von Kontrolltieren (100%) generiert wurde, dar.

B zeigt die prozentualen Anteile von CIA-generierten Osteoklasten zu Kontrollen im Zeitverlauf der CIA.

N (Kontrolle/CIA) = 10d (8), 15d (7/8), 20d (7/8), 40d (9/8).

C Die Genexpressionsdaten verschiedener Differenzierungsmarker von Osteoklasten, die aus KMM arthritischer Tiere generiert wurden sind relativ zur Expression von Osteoklasten, die aus den KMM NaCl-behandelter Ratten differenziert wurden, dargestellt (Null-Linie). Die Expression der mRNA der Differenzierungsmarker wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert und als *log fold change* zum Kalibrator (Basis 2) dargestellt.

Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. Boxplots umfassen das 10te bis 90te Perzentil der Datensätze. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

	10 Tage n. I.	15 Tage n. I.	20 Tage n. I.	40 Tage n. I.
Calcitonin Rezeptor (n=12-15)	***-1,19±0,25	** -0,65±0,21	-0,43±0,33	-0,28±0,21
Rank Rezeptor (n=10-15)	** -0,63±0,11	** -0,60±0,19	-0,05±0,31	* -0,30±0,14
M-CSF Rezeptor (n=7-12)	** -0,66±0,16	** -0,30±0,10	-0,28±0,17	-0,17±0,14
NFATc1 (n=10-11)	* -0,39±0,17	** -0,46±0,12	-0,62±0,31	** -0,35±0,10
Integrin β 3 (n=6-8)	* -0,57±0,19	* -0,70±0,21	0,04±0,20	-0,26±0,08
Integrin α v (n=6-8)	* -0,52±0,17	** -0,61±0,14	-0,05±0,18	-0,19±0,17

Tabelle 4-2: Genexpression von Osteoklastenmarkern im Zeitverlauf von CIA.

Die Tabelle zeigt die Genexpressionsdaten von Markergenen von Osteoklasten arthritischer Tiere relativ zur Expression von Osteoklasten NaCl-behandelter Ratten im Zeitverlauf der CIA. Die Expression der Marker-mRNA wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert und als Mittelwert \pm SEM des *log fold change* zum Kalibrator (Basis 2) dargestellt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Um den Einfluss von ACh, NA und VIP auf die Osteoklastendifferenzierung zu untersuchen, wurde während des gesamten Differenzierungszeitraums mit verschiedenen Konzentrationen der Neurotransmitter stimuliert. Die Ergebnisse sind als prozentuale Anteile bezogen auf die jeweiligen unstimulierten Kulturen von Kontroll- und CIA-KMM dargestellt (durchgezogene Linie = 100%, Abbildung 4-16).

Stimulation mit 10^{-6} und 10^{-8} M ACh bewirkte eine um rund 50% erhöhte Osteoklastenzahl in der KMM-Kultur aus Kontrolltieren in Relation zu der unstimulierten KMM-Kultur, während für CIA-KMM der Effekt nur bei einer Konzentration von 10^{-8} M ACh zu beobachten war (Abb. 4-16A). Das Neuropeptid VIP hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Osteoklastogenese von KMM (Abb. 4-16B). Die Stimulation mit NA induzierte, dosisabhängig, entgegengesetzte Effekte: so wurde durch 10^{-6} M NA, das über β -Adrenozeptoren wirkt, die Osteoklastogenese in Kontroll- und CIA-KMM inhibiert, während durch 10^{-8} M NA, das über α -Adrenozeptoren wirkt, die Osteoklastogenese verstärkt wurde (Abb. 4-16C). Betrachtet man den Einfluss von ACh und NA auf die Osteoklastogenese im Zeitverlauf der Arthritis, wird deutlich, dass sich der Einfluss der Stimulation über die Zeit veränderte, in Kontroll-KMM genauso wie in CIA-KMM (Abb. 4-16D, E). Stimulation mit 10^{-8} M ACh verstärkte die Osteoklastogenese in CIA-KMM 15 Tage nach Immunisierung, wohingegen in Kontroll-KMM durch Stimulation mit 10^{-6} und 10^{-8} M ACh die Osteoklastenzahl 40 Tage nach NaCl-Behandlung signifikant erhöht wurde (Abb. 4-16D). Die Erhöhung der Osteoklastenzahl durch Stimulation mit 10^{-8} M NA war in den CIA-KMM 15 Tage nach Immunisierung wirksam, während Kontroll-KMM, 40 Tage nach NaCl-Behandlung, mit einer signifikanten Erhöhung der Osteoklastenzahl reagierten (Abb. 4-16E). Durch 10^{-6} M NA wurde eine konstante Inhibition in der Osteoklastendifferenzierung

von Kontroll-KMM bewirkt, ausgenommen 20 Tage nach NaCl-Behandlung, während die inhibierende Wirkung auf die Differenzierung in den CIA-KMM nur 10 Tage nach Immunisierung wirksam war (Abb. 4-16E).

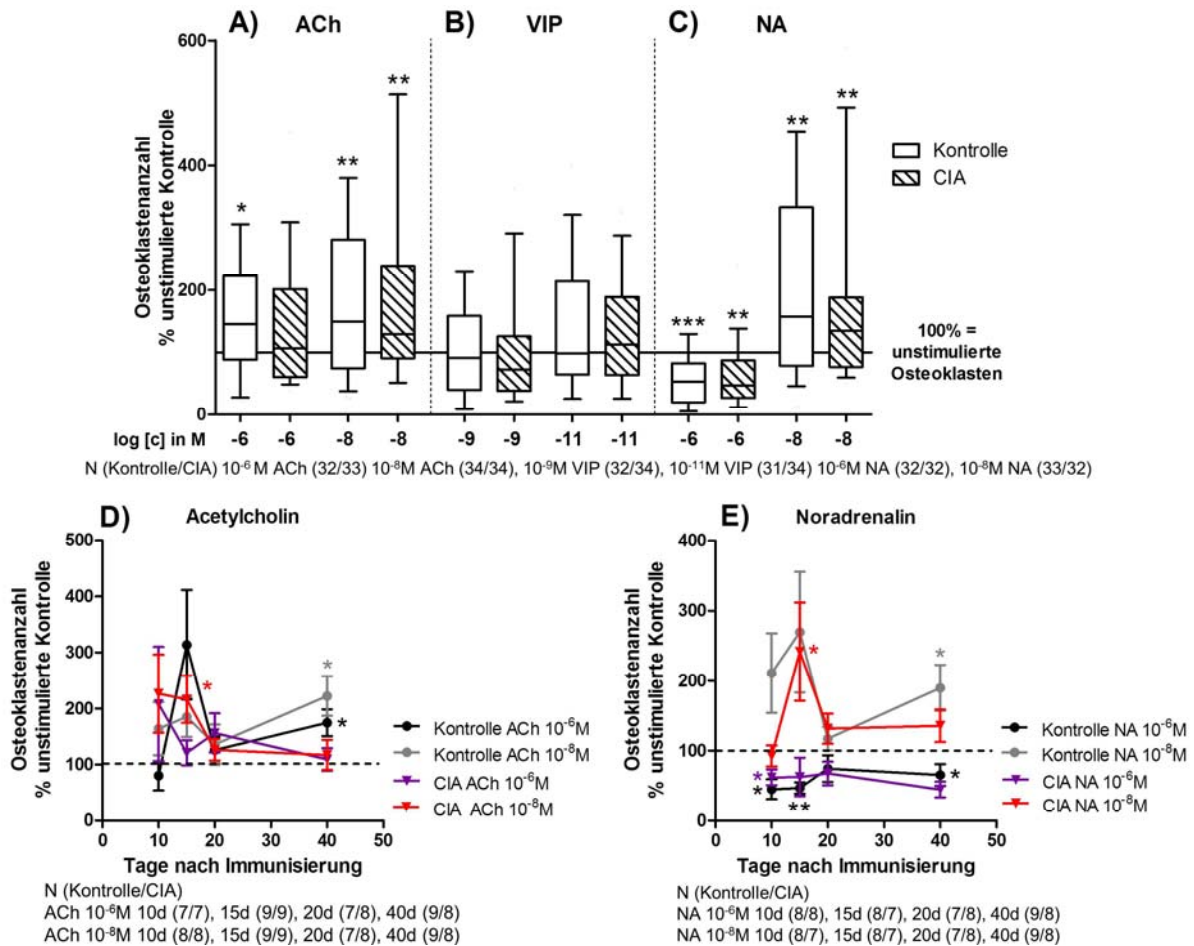


Abbildung 4-16: Einfluss der Neurotransmitter ACh, NA und VIP auf die Osteoklastenzahl.

A-C Der Einfluss der Stimulation mit ACh (A), VIP (B) und NA (C) auf die Osteoklastenzahl ist als prozentualer Anteil zu den unstimulierten Kulturen von KMM aus NaCl-behandelten und immunisierten Ratten dargestellt (100% = durchgezogene Linie).

D-E zeigen den Einfluss der Stimulation mit ACh (D) und NA (E) auf die Differenzierung von KMM zu Osteoklasten im Zeitverlauf der CIA als prozentualen Anteil zu den jeweiligen unstimulierten KMM-Kulturen (100% = gestrichelte Linie).

Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. Boxplots umfassen das 10te bis 90te Perzentil der Datensätze. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

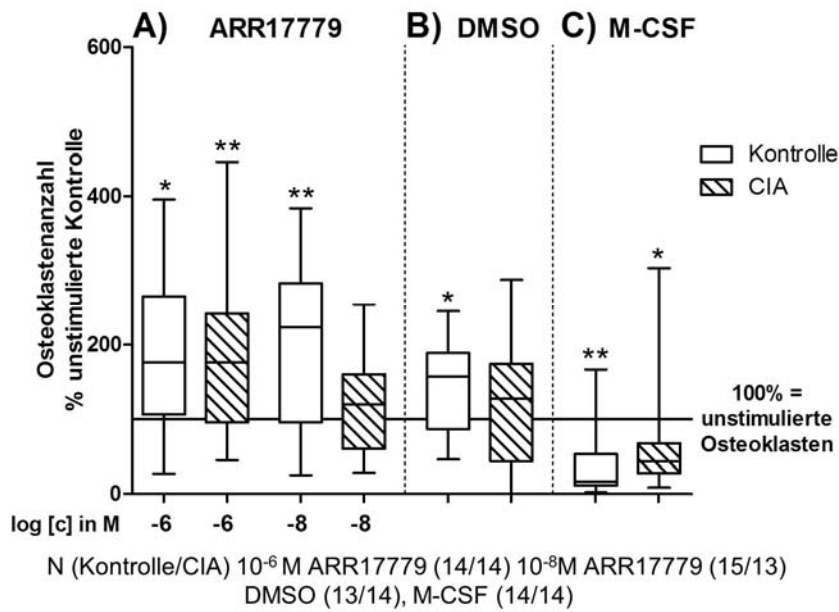


Abbildung 4-17: Einfluss von ARR17779 auf die Osteoklastenanzahl.

Effekte der Stimulation mit ARR17779 (A), dem Lösungsmittel DMSO (B) und M-CSF (C) auf die Osteoklastenanzahl sind als prozentualer Anteil zu den unstimulierten Kulturen von KMM aus NaCl-behandelten und immunisierten Ratten dargestellt (100% = durchgezogene Linie). Boxplots umfassen das 10te bis 90te Perzentil der Datensätze. *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001.

Durch 10⁻⁶M und 10⁻⁸M ARR17779 wurde die Osteoklastogenese von Kontroll-KMM signifikant verstärkt, was aber auf Effekte des Lösungsmittels DMSO zurückgeführt werden kann (Abb. 4-17A, B). In den CIA-KMM führte nur die hohe Dosis 10⁻⁶M ARR17779 zu einer höheren Osteoklastenanzahl, während gleichzeitig keine signifikanten Effekte durch alleinige Stimulation mit dem Lösungsmittel DMSO zu beobachten waren (Abb. 4-17A, B). Die Frage bleibt, ob ARR17779 eine Wirkung auf die osteoklastogene Differenzierung von CIA-KMM hat, oder ob, aufgrund der hohen Streuung der DMSO-Ergebnisse, eine Signifikanz verhindert wurde. Um zu untersuchen, wie hoch die spontane Osteoklastendifferenzierung in den Kulturen von Kontroll- und CIA-KMM war, wurden die KMM 5 Tage in Medium kultiviert, dass 20ng/ml M-CSF und kein RankL enthielt. Sowohl in den Kulturen der KMM aus immunisierten Ratten, als auch in den Kulturen von KMM aus Kontrolltieren, konnte die spontane Entstehung von Osteoklasten beobachtet werden, die Anzahl war aber deutlich geringer als nach Stimulation mit M-CSF und RankL (Abb. 4-17C).

4.3.2.2 Zellkernanzahl

Die Bestimmung der Zellkernanzahl von Osteoklasten ist ein Indikator für die Verschmelzungsrate von Vorläuferzellen, den KMM, zu mehrkernigen Osteoklasten. Die Kernzahl kann ein Indikator für die Aktivität von Osteoklasten sein. Die ausgezählten Osteoklastenkulturen wurden in drei Kategorien eingeteilt: Osteoklasten mit 3-5 Zellkernen (klein), mit 6-10 Zellkernen (mittel) und sehr große Osteoklasten mit mehr als 10 Zellkernen.

In einzelnen Experimenten wurden Osteoklasten mit 50-100 und mehr Kernen beobachtet, die aber nicht weiter kategorisiert wurden.

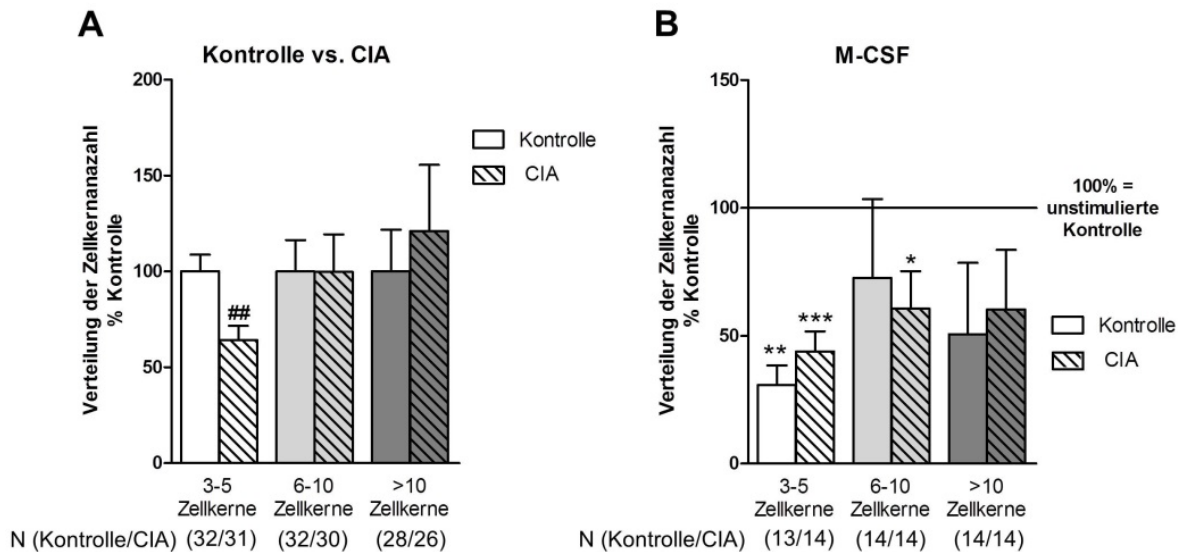


Abbildung 4-18: Einfluss von CIA auf die Kernanzahl von Osteoklasten.

Nach 5 Tagen Differenzierung wurden TRAP-gefärbte Zellen mit mehr als drei Zellkernen, die als Osteoklasten gelten, ausgezählt und entsprechend ihrer Zellkernanzahl (Osteoklasten mit 3-5, 6-10 und mehr als 10 Zellkernen) kategorisiert.

A stellt die Osteoklastenanzahl in den Zellkernkategorien, die aus CIA-KMM generiert wurden, prozentual zur jeweiligen Osteoklastenanzahl von Kontrolltieren (100%) dar.

B zeigt die Osteoklastenanzahl in den Zellkernkategorien aus den KMM-Kulturen arthritischer und NaCl-behandelter Ratten, die nur in Gegenwart von M-CSF kultiviert wurden, als prozentualen Anteil zu den jeweiligen unstimulierten Osteoklastenkulturen dar.

Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. ## $p < 0,01$ Kontrolle vs. CIA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ M-CSF vs. M-CSF/RankL.

Abbildung 4-18A zeigt die Verteilung der Osteoklastenanzahl auf die drei Kern-Kategorien. Die jeweilige Anzahl von Osteoklasten pro Kernanzahl-Kategorie, die aus den KMM von NaCl-behandelten Tieren differenziert wurden, wurden auf 100% gesetzt und die Ergebnisse der Osteoklasten aus den arthritischen Tieren prozentual darauf bezogen. Die KMM aus den arthritischen Ratten bildeten signifikant weniger kleine Osteoklasten mit 3-5 Zellkernen im Vergleich zu den entsprechenden Kulturen der Kontroll-Osteoklasten, dafür war die Anzahl großer Osteoklasten mit mehr als 10 Nuclei tendenziell erhöht (Abb. 4-18A).

Als Kontrolle für spontane Osteoklastendifferenzierung wurden KMM in Gegenwart von M-CSF kultiviert, ohne Zusatz von RankL (Abb. 4-18B). Die Ergebnisse sind als prozentualer Anteil der Osteoklastenanzahl der jeweiligen Kernkategorie bezogen auf die Osteoklastenanzahl aus den entsprechenden Kulturen mit kombinierter M-CSF/RankL-Stimulation dargestellt. Auch ohne Zugabe von RankL kann die spontane Ausbildung von Osteoklasten beobachtet werden, aber es entstehen signifikant weniger kleine Osteoklasten (3-

5 Zellkerne) sowohl aus den KMM von Kontrolltieren als auch aus den KMM immunisierter Tiere, während die immunisierten Tiere auch signifikant weniger mittelgroße Osteoklasten aufweisen (6-10 Zellkerne). Die Anzahl von Osteoklasten mit mehr als 10 Zellkernen von KMM, die allein mit M-CSF kultiviert wurden, unterscheidet sich nicht signifikant von der Anzahl nach Differenzierung mit M-CSF/RankL.

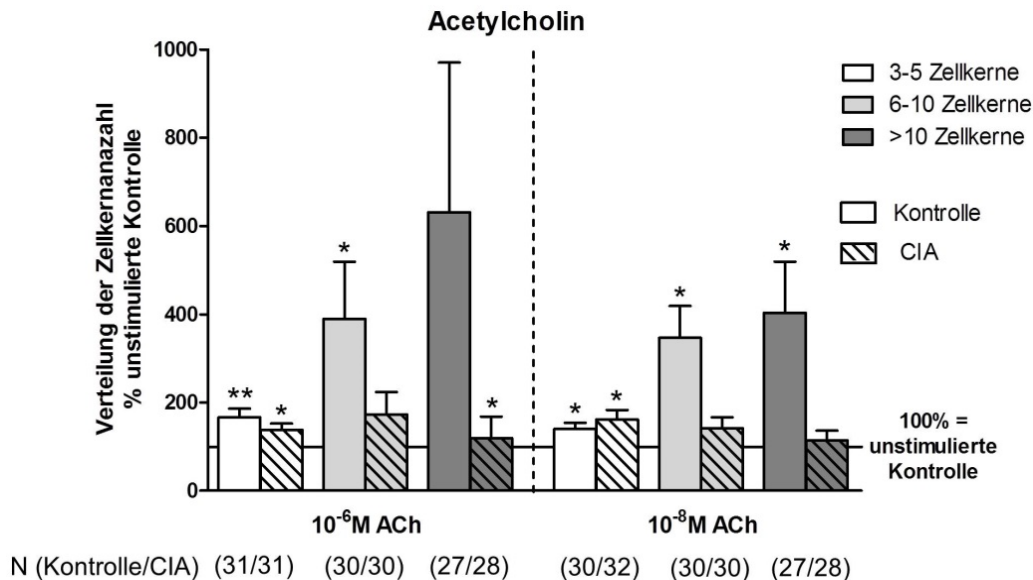


Abbildung 4-19: Einfluss von Acetylcholin auf die Kernanzahl von Osteoklasten.

Nach 5 Tagen Differenzierung in Gegenwart von 10^{-6} und 10^{-8} M ACh wurden TRAP-gefärbte Zellen mit mehr als drei Zellkernen, die als Osteoklasten gelten, ausgezählt und entsprechend ihrer Zellkernanzahl (Osteoklasten mit 3-5, 6-10 und mehr als 10 Zellkernen) kategorisiert. Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ACh vs. unstimuliert.

Der Einfluss der Neurotransmitter ACh, NA und VIP und des ACh-Rezeptoragonisten ARR17779 auf die Kernanzahl von Osteoklasten wurde ebenfalls in Relation zur jeweiligen Osteoklastenanzahl in den entsprechenden Kernzahl-Kategorien nach Differenzierung mit M-CSF/RankL (unstimuliert, 100%) dargestellt (Abb. 4-19, 4-20, 4-21, 4-22).

Stimulation mit 10^{-6} und 10^{-8} M ACh induzierte die Erhöhung der Osteoklastenanzahl mit 3-5 Kernen, sowohl in Osteoklastenkulturen, die aus den KMM immunisierter Tiere angelegt wurden, als auch in Kulturen aus den KMM von NaCl-behandelten Tieren. Durch 10^{-6} M ACh wurden vermehrt Osteoklasten mit 6-10 Zellkernen in Kulturen aus Kontroll-KMM in Relation zum unstimulierten Zellkulturansatz induziert, wohingegen in Kulturen aus CIA-KMM, die Anzahl großer Osteoklasten mit mehr als 10 Zellkernen signifikant erhöht wurde. Stimulation mit 10^{-8} M ACh verstärkte die Entstehung von Osteoklasten mit 6-10 und mehr als 10 Zellkernen allein in KMM aus NaCl-behandelten Ratten, während CIA im Vergleich eine

Hemmung der ACh-induzierten Differenzierung sehr großer Osteoklasten verursachte (Abb. 4-19).

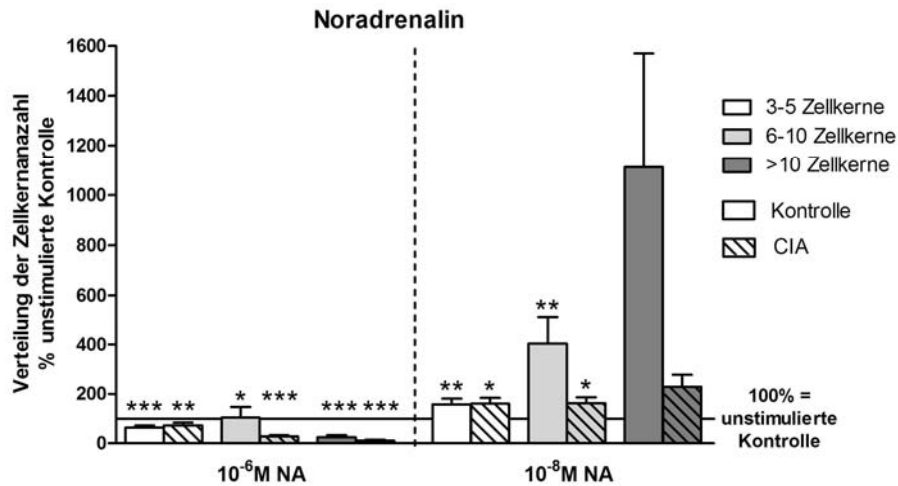


Abbildung 4-20: Einfluss von Noradrenalin auf die Kernanzahl von Osteoklasten.

Nach 5 Tagen Differenzierung in Gegenwart von 10^{-6} und 10^{-8} M NA wurden TRAP-gefärbte Zellen mit mehr als drei Zellkernen, die als Osteoklasten gelten, ausgezählt und entsprechend ihrer Zellkernanzahl (Osteoklasten mit 3-5, 6-10 und mehr als 10 Zellkernen) kategorisiert.

Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ NA vs. unstimuliert.

Noradrenerge Effekte auf die Kernanzahl waren konzentrationsabhängig reziprok. Durch 10^{-6} M NA wurde die Anzahl von Osteoklasten jeder Kernkategorie im Vergleich zu der Anzahl in den unstimulierten Kulturen reduziert unabhängig ob die entsprechenden KMM aus immunisierten oder NaCl-behandelten Tieren isoliert wurden. Durch 10^{-8} M NA erhöhte sich dagegen die Anzahl von Osteoklasten mit 3-5 und 6-10 Zellkernen verglichen mit den jeweiligen unstimulierten Osteoklastenkulturen immunisierter und NaCl-behandelter Tiere. In Kulturen aus Kontrolltieren war durch 10^{-8} M NA-Zugabe tendenziell ein Anstieg in der Anzahl sehr großer Osteoklasten zu beobachten ($p = 0,0991$).

VIP-Zugabe während der Differenzierung hatte folgende Effekte auf die Kernanzahl im Vergleich zu unstimulierten KMM-Kulturen (Abb. 4-21): Stimulation mit 10^{-9} M VIP hemmte die Entstehung von Osteoklasten mit 6-10 und mehr als 10 Zellkernen in KMM-Kulturen aus immunisierten Ratten, wohingegen 10^{-11} M VIP in KMM-Kulturen aus NaCl-behandelten Ratten, in Relation zur entsprechenden unstimulierten KMM-Kultur, die Entstehung von Osteoklasten mit 6-10 Zellkernen begünstigte. Bezüglich der Anzahl von großen Osteoklasten mit mehr als 10 Zellkernen nach Stimulation mit 10^{-9} und 10^{-11} M VIP konnte ein deutlicher Einfluss von CIA beobachtet werden. Die Anzahl von Osteoklasten mit mehr als 10

Zellkernen war in den KMM-Kulturen aus arthritischen Tieren signifikant niedriger als in den KMM-Kulturen aus den Kontrolltieren.

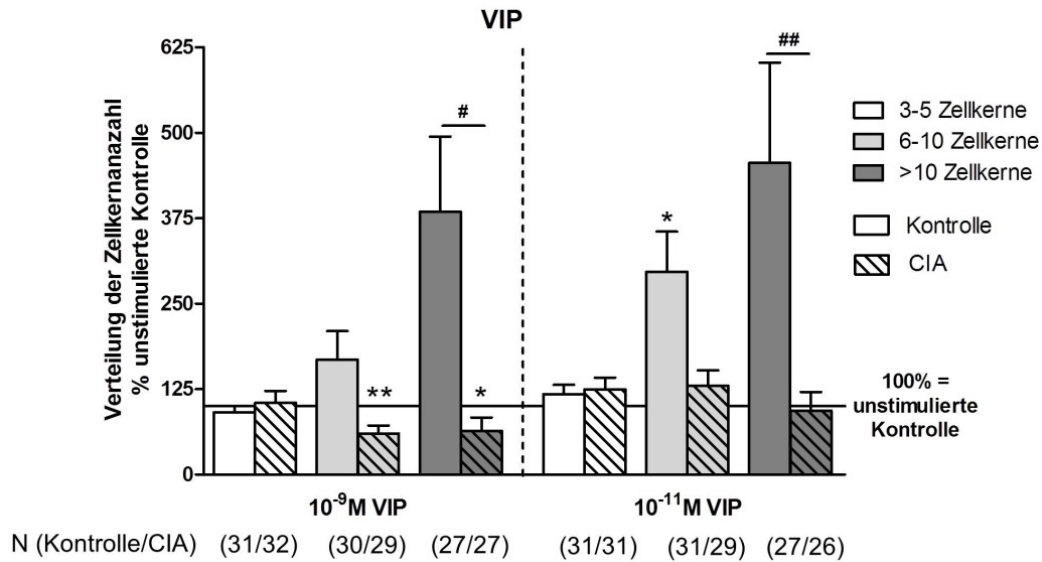


Abbildung 4-21: Einfluss von VIP auf die Kernanzahl von Osteoklasten.

Nach 5 Tagen Differenzierung in Gegenwart von 10⁻⁹ und 10⁻¹¹M VIP wurden TRAP-gefärbte Zellen mit mehr als drei Zellkernen, die als Osteoklasten gelten, ausgezählt und entsprechend ihrer Zellkernanzahl (Osteoklasten mit 3-5, 6-10 und mehr als 10 Zellkernen) kategorisiert. Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM. #p<0,05, ##p<0,01 Kontrolle vs CIA. *p<0,05, **p<0,01 VIP vs. unstimuliert.

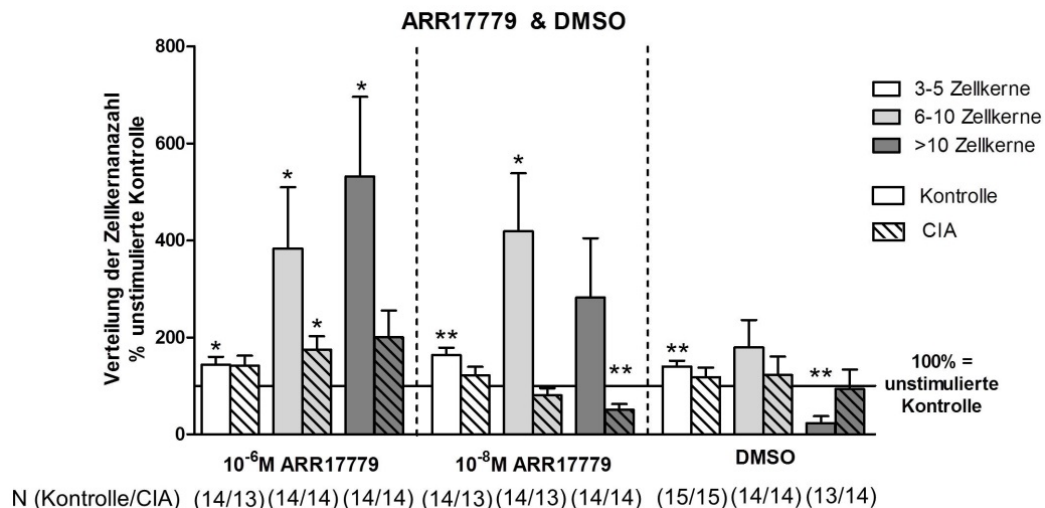


Abbildung 4-22: Einfluss von ARR17779 und DMSO auf die Kernanzahl von Osteoklasten.

Nach 5 Tagen Differenzierung in Gegenwart von 10⁻⁶ und 10⁻⁸M ARR17779 oder DMSO wurden TRAP-gefärbte Zellen mit mehr als drei Zellkernen, die als Osteoklasten gelten, ausgezählt und entsprechend ihrer Zellkernanzahl (Osteoklasten mit 3-5, 6-10 und mehr als 10 Zellkernen) kategorisiert. Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM. *p<0,05, **p<0,01 ARR17779/DMSO vs. unstimuliert.

Der spezifische Agonist für den nikotinergen $\alpha 7$ ACh-Rezeptor, ARR17779, bewirkte in einer Konzentration von 10^{-6} M in den KMM-Kulturen NaCl-behandelter Ratten eine Erhöhung der Osteoklastenzahl in allen drei Kernkategorien (3-5, 6-10, >10 Zellkerne), in den KMM-Kulturen immunisierter Tiere dagegen einzig eine Zunahme von Osteoklasten mit 6-10 Zellkernen (Abb. 4-22). Durch 10^{-8} M ARR17779 wurde die Bildung von Osteoklasten mit 3-5 und 6-10 Zellkernen aus den KMM NaCl-behandelter Tiere verstärkt. Im Gegensatz dazu wurde die Fusionierung von KMM aus immunisierten Ratten zu sehr großen Osteoklasten mit mehr als 10 Zellkernen durch 10^{-8} M ARR17779 gehemmt. Gleichzeitig auftretende Lösungsmittelleffekte durch DMSO sind geringfügig und betreffen nur die Differenzierung von KMM aus NaCl-behandelten Tieren, wo sie die Anzahl der 3-5-kernigen Osteoklasten im Vergleich zu den unstimulierten Kulturen erhöhen und die Anzahl der Osteoklasten mit mehr als 10 Zellkernen reduzieren.

4.3.3 Caspase 3/7-Aktivität von Osteoklasten

Ein weiterer Faktor, der die *in vivo*-Osteoklastendifferenzierung beeinflussen könnte, ist die Apoptose-Aktivität von Vorläuferzellen (KMM) sowie von ausdifferenzierten Osteoklasten. *In vitro* konnte in dieser Arbeit kein Einfluss von CIA auf die Caspase 3/7-Aktivität von KMM, den Osteoklastenvorläuferzellen, festgestellt werden (4.2.5.).

In Relation zu Osteoklasten, die aus den KMM NaCl-behandelter Ratten differenziert wurden, zeigten Osteoklasten, die aus den KMM arthritischer Tiere generiert wurden, eine um 50% erhöhte Apoptose-Rate nach M-CSF/Rankl-Deprivation (Abb. 4-23A). Betrachtet man die unterschiedlichen Arthritis-Stadien, so wird deutlich, dass der Effekt schon 10 Tage nach Immunisierung einsetzt und bis zur akuten Phase anhält (20 Tage, Abb. 4-23B). Die Analyse von Markergenen, die mit Apoptose- bzw. Survival-bezogenen Signalwegen assoziiert werden, zeigte eine deutlich verringerte mRNA-Expression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-2 und der Kinasen Erk1, Erk2 und Akt1 (Abb. 4-23C). Bei näherer Betrachtung des Einflusses der verschiedenen CIA-Phasen auf die Genexpression wird deutlich, dass Bcl-2 im gesamten Verlauf vermindert exprimiert wurde, während die anderen Gene vorrangig in den frühen Phasen, 10 und 15 Tage nach Immunisierung, herunterreguliert wurden (Tabelle 4-3).

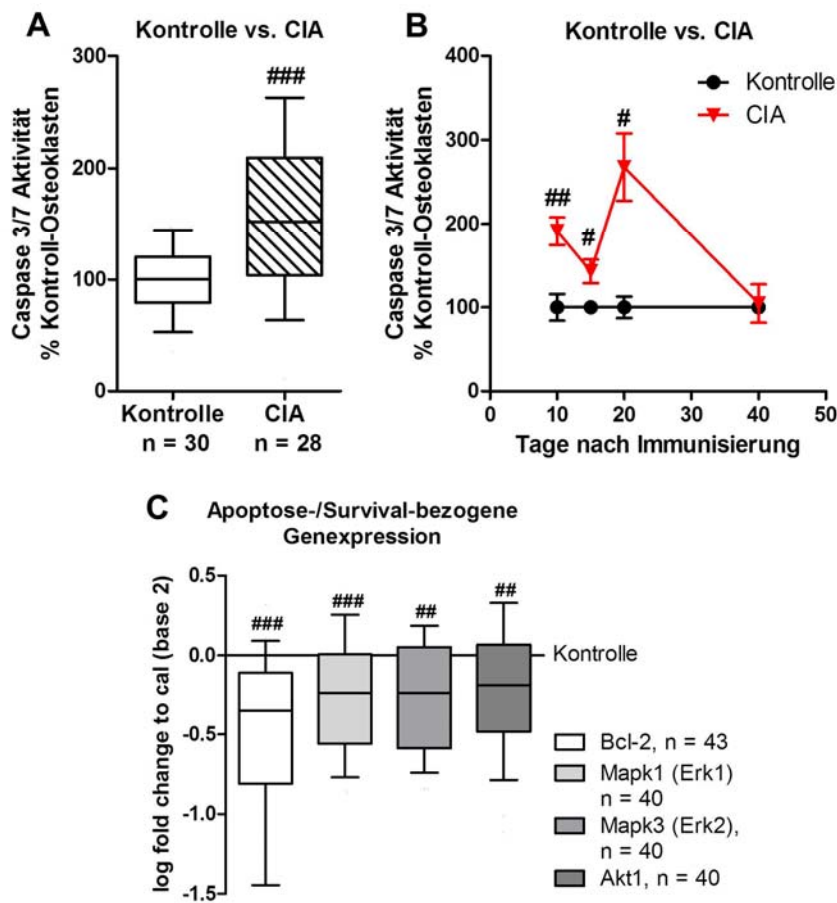


Abbildung 4-23: Einfluss von CIA auf die Caspase 3/7-Aktivität von Osteoklasten und die Genexpression von Apoptose-/Survival-bezogenen Genen.

A stellt die Caspase 3/7-Aktivität von Osteoklasten, die aus CIA-KMM generiert wurde, prozentual zur Caspase 3/7-Aktivität von Osteoklasten, die aus den KMM von Kontrolltieren (100%) generiert wurden, dar.

B stellt die Caspase 3/7-Aktivität von Osteoklasten, die aus CIA-KMM generiert wurde, prozentual zur Caspase 3/7-Aktivität von Osteoklasten, die aus den KMM von Kontrolltieren (100%) generiert wurden, im Zeitverlauf der CIA dar.

N (Kontrolle/CIA) = 10d (6/6), 15d (8/8), 20d (8/8),

40d (8/8).

C Die Genexpressionsdaten von Apoptose/Survival-bezogenen Genen von Osteoklasten, die aus KMM arthritischer Tiere generiert wurden sind relativ zur Genexpression von Osteoklasten aus den KMM NaCl-behandelter Ratten dargestellt (Null-Linie). Die Expression der mRNA der untersuchten Gene wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert und als *log fold change* zum Kalibrator (Basis 2) dargestellt. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. Boxplots umfassen das 10te bis 90te Perzentil der Datensätze. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$.

Bezogen auf die Caspase 3/7-Aktivität konnte nur ein geringer Einfluss der Neurotransmitter ACh, NA und VIP festgestellt werden (Abb. 4-24A, B, C). Allein die Stimulation mit 10^{-8} M NA führte zu einer Erhöhung der Caspase-Aktivität in den Osteoklasten NaCl-behandelter Ratten (Abb. 4-24C). Betrachtet man den Verlauf der Arthritis, kann für 10^{-6} M ACh eine inhibierende Wirkung auf die Caspase 3/7-Aktivität von Osteoklasten, die aus KMM von Ratten 10 Tage nach Immunisierung differenziert wurden, feststellen (Abb. 4-24E). Demgegenüber bewirkten 10^{-6} M und 10^{-8} M NA einen Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität von Osteoklasten aus NaCl-behandelten Kontrollen 40 Tage nach NaCl-Applikation (Abb. 4-24F).

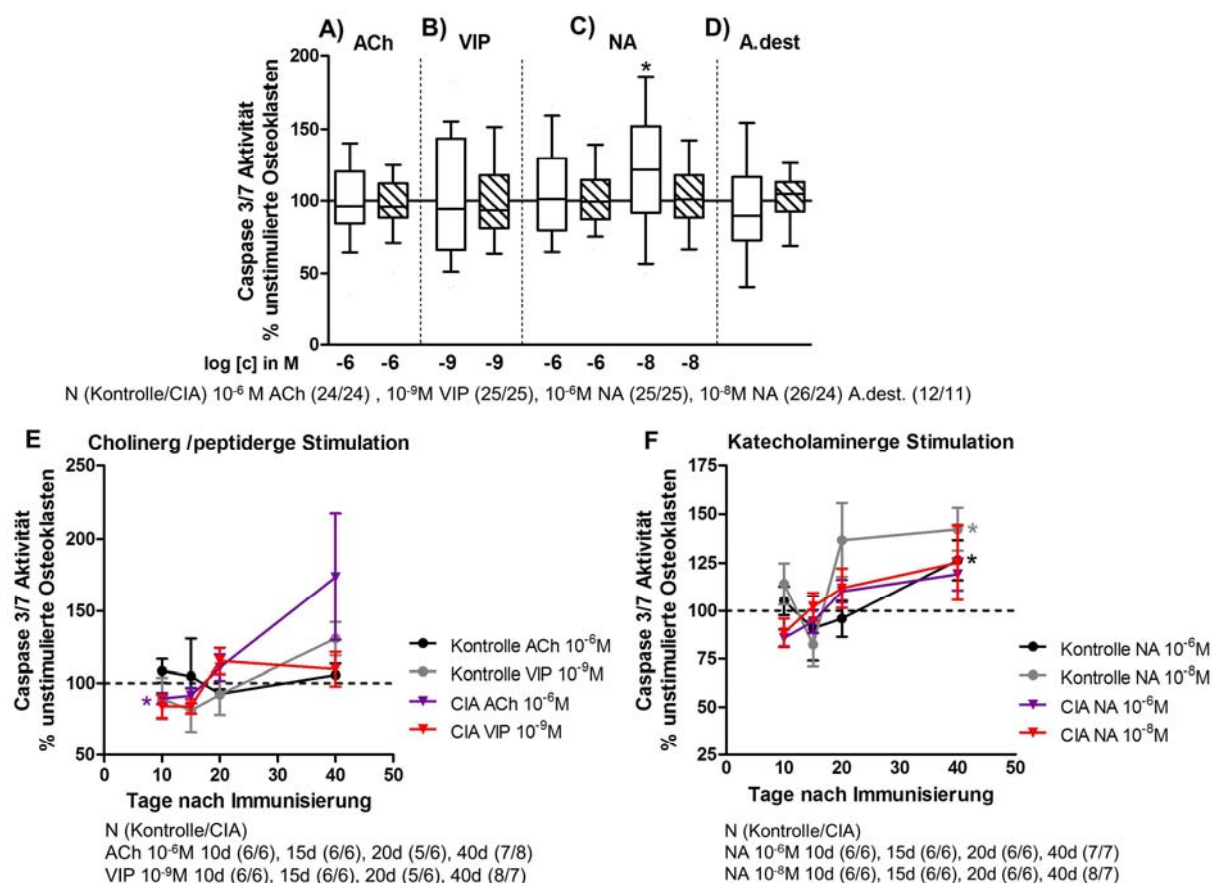


Abbildung 4-24: Einfluss von ACh, NA und VIP auf die Caspase 3/7-Aktivität von Osteoklasten. A-D Einfluss von ACh (A), VIP (B) und NA (C) sowie des Lösungsmittels A.dest (D) auf die Caspase 3/7-Aktivität von Osteoklasten, die aus CIA-KMM oder Kontroll-KMM generiert wurden, prozentual zur Caspase 3/7-Aktivität der entsprechenden unstimulierten Kulturen (100%).

E-F stellt den Einfluss von ACh, VIP (E) und NA (F) auf die Caspase 3/7-Aktivität von Osteoklasten, bezogen auf die Effekte in den jeweiligen unstimulierten Kulturen, im Zeitverlauf der CIA dar. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. Boxplots umfassen das 10te bis 90te Perzentil der Datensätze. * $p < 0,05$.

Da der Wachstumsfaktor M-CSF essentiell für das Überleben von Osteoklasten und deren Vorläuferzellen ist, wurde die Genexpression von Molekülen, die zum M-CSF-Signalweg gehören, zwischen Osteoklasten aus NaCl-behandelten und arthritischen Tieren verglichen (Abbildung 4-25). Die mRNA-Expression des Adapterproteins Grb2, des *guanin nucleotide exchange factors* SOS1 sowie des Transkriptionsfaktors Foxo3 war in den Osteoklasten arthritischer Tiere signifikant herunterreguliert, verglichen mit der mRNA-Expression von Osteoklasten aus Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu war die Genexpression von c-Myc, einem Transkriptionsfaktor mit multifunktionalen Aufgaben im Bereich der Zellzyklusregulation, Apoptose und Zelltransformation, in den Osteoklasten aus den arthritischen Tieren signifikant verstärkt im Vergleich zu den Kontroll-Osteoklasten. Die verstärkte Genexpression von c-myc trat spezifisch mit dem Auftreten der ersten Arthritissymptome ein und konnte dann in

der chronischen CIA-Phase erneut beobachtet werden (Tabelle 4-3). Die Reduktion der Genexpression der übrigen Gene war zumeist auf 10 und 15 Tage nach Immunisierung begrenzt, ausgenommen Foxo3.

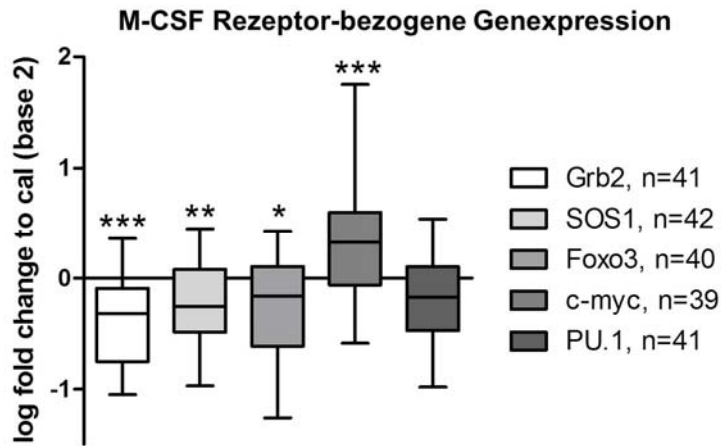


Abbildung 4-25: Genexpression von Komponenten des M-CSF-Rezeptorsignalweges.

Die Genexpressionsdaten von Osteoklasten, die aus den KMM arthritischer Tiere generiert wurden, sind relativ zur Expression von Osteoklasten, die aus den KMM NaCl-behandelter Ratten differenziert wurden, dargestellt (Null-Linie). Die Expression der entsprechenden mRNA wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert und als *log fold change* zum Kalibrator (Basis 2) dargestellt.

Boxplots umfassen das 10te bis 90te Perzentil der Datensätze. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

	10 Tage n. I.	15 Tage n. I.	20 Tage n. I.	40 Tage n. I.
M-CSF Rezeptor (n=7-12)	** $-0,66 \pm 0,16$	** $-0,30 \pm 0,10$	$-0,28 \pm 0,17$	$-0,17 \pm 0,14$
Grb2 (n=8-13)	*** $-0,73 \pm 0,12$	*** $-0,43 \pm 0,08$	$-0,20 \pm 0,11$	$-0,15 \pm 0,13$
SOS1 (n=8-13)	** $-0,49 \pm 0,11$	$-0,11 \pm 0,10$	$-0,13 \pm 0,14$	$-0,18 \pm 0,09$
Erk1 (n=8-13)	** $-0,60 \pm 0,12$	** $-0,28 \pm 0,08$	* $-0,25 \pm 0,10$	$-0,03 \pm 0,11$
Erk2 (n=8-12)	** $-0,54 \pm 0,15$	* $-0,21 \pm 0,08$	$-0,21 \pm 0,11$	$-0,09 \pm 0,11$
Akt1 (n=7-12)	* $-0,44 \pm 0,19$	$-0,16 \pm 0,09$	* $-0,25 \pm 0,14$	$-0,03 \pm 0,11$
Foxo3 (n=7-13)	** $-0,56 \pm 0,15$	$-0,11 \pm 0,10$	$-0,02 \pm 0,11$	* $-0,40 \pm 0,18$
c-myc (n=8-12)	$0,12 \pm 0,12$	*** $0,69 \pm 0,15$	$-0,02 \pm 0,12$	* $0,71 \pm 0,32$
PU.1 (n=8-13)	* $-0,36 \pm 0,15$	* $-0,22 \pm 0,10$	$-0,25 \pm 0,13$	$0,07 \pm 0,06$
Bcl-2 (n=11)	* $-0,44 \pm 0,17$	*** $-0,69 \pm 0,11$	** $-0,87 \pm 0,26$	* $-0,18 \pm 0,08$

Tabelle 4-3: Genexpressionsdaten für Moleküle des M-CSF-Signalweges und Apoptose / Survival-bezogene Moleküle.

Die Tabelle zeigt die Genexpressionsdaten von Molekülen des M-CSF-Signalweges und von Molekülen, die mit Zellapoptose und –überleben assoziiert sind im Zeitverlauf von CIA. Genexpressionsdaten von CIA-KMM sind relativ zur Expression von Kontroll-KMM (=0) wiedergegeben. Die Expression wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert und als Mittelwert \pm SEM des *log fold change* zum Kalibrator (Basis 2) dargestellt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. n.I. – nach Immunisierung.

4.3.4 Untersuchungen zur Osteoklastenaktivität

4.3.4.1 Enzymaktivität von Kathepsin K

Da die Bestimmung der Osteoklastenanzahl wenig Aussagekraft bezüglich der tatsächlichen Resorptionsaktivität hat, wurde die Enzymaktivität von Kathepsin K im Überstand der Osteoklastenkulturen von arthritischen und Kontrolltieren untersucht. Kathepsin K ist hauptverantwortlich für den enzymatischen Abbau des proteinogenen Anteils der Knochenmatrix und kann so durch die Zugabe eines geeigneten Substrates im Kulturüberstand nachgewiesen werden.

Durch CIA wurde die Kathepsin K-Aktivität im Überstand der Osteoklasten signifikant inhibiert im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollkulturen (Abb. 4-26A). Betrachtet man den CIA-Effekt in den unterschiedlichen Arthritis-Stadien, so wird deutlich erkennbar, dass der Effekt tendenziell in der akuten CIA-Phase auftrat, aber erst in der chronischen Phase Signifikanz erreichte (Abb. 4-26B). Auch die Genexpression von Kathepsin K wurde durch CIA signifikant gehemmt (Abb. 4-30C), allerdings zeigte die Analyse der Kathepsin K-Aktivität im CIA-Zeitverlauf einen hemmenden Einfluss von CIA vor allem 10 und 15 Tage nach Immunisierung (Tabelle 4-4).

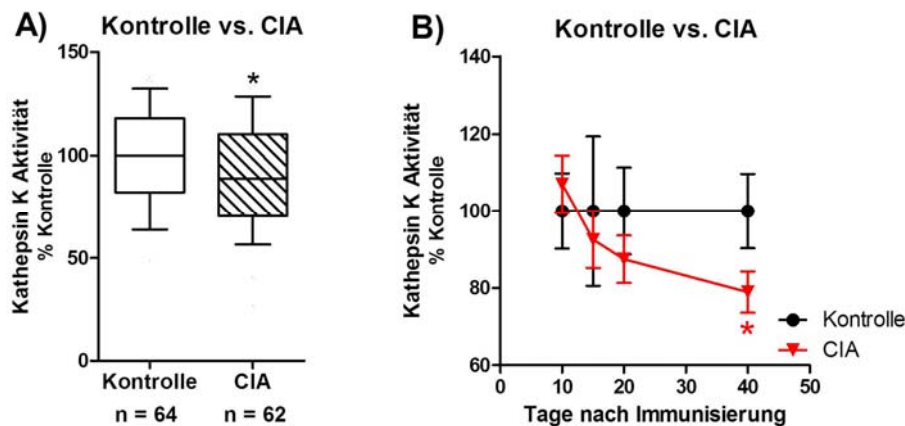


Abbildung 4-26: Einfluss von CIA auf die Kathepsin K Aktivität.

A stellt die Kathepsin K-Aktivität in Kulturüberständen von Osteoklasten, die aus CIA-KMM generiert wurden, prozentual zur Kathepsin K-Aktivität von Osteoklasten, die aus KMM von Kontrolltieren (100%) generiert wurden, dar.

B stellt die Kathepsin K-Aktivität im Überstand von Osteoklasten, die aus CIA-KMM generiert wurden, prozentual zur Kathepsin K-Aktivität von Osteoklasten, die aus KMM von Kontrolltieren (100%) generiert wurden, im Zeitverlauf der CIA dar.

N (Kontrolle/CIA) = 10d (11/12), 15d (14/13), 20d (19/19), 40d (20/18).

Boxplots umfassen das 10te bis 90te Perzentil der Datensätze. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$.

Weiterhin wurde auch der Einfluss der sympathischen Neurotransmitter ACh, VIP und NA auf die Kathepsin K-Aktivität untersucht. Die Ergebnisse der Stimulationsexperimente sind als prozentuale Anteile zu den jeweiligen unstimulierten Kulturen von Osteoklasten, die aus KMM NaCl-behandelten bzw. arthritischen Tiere generiert wurden, dargestellt. Durch 10^{-6} M ACh wurde die Kathepsin K-Aktivität in Überständen von Osteoklastenkulturen arthritischer und NaCl-behandelter Ratten deutlich erhöht, während 10^{-8} M ohne Effekte blieb (Abb. 4-27A). Betrachtet man den ACh-Einfluss in den unterschiedlichen CIA-Phasen sind keine eindeutigen Phasen-bezogenen Effekte erkennbar. Ausgenommen ist Tag 15 nach NaCl-Behandlung, an dem Stimulation mit 10^{-6} M ACh in den Überständen der Osteoklastenkulturen der Kontrollen eine signifikante Erhöhung der Kathepsin K-Aktivität hervorrief (Abb. 4-27E). Im Gegensatz zu ACh, wurde durch Anwesenheit von VIP und NA während der Osteoklastendifferenzierung, die Aktivität von Kathepsin K gehemmt (Abb. 4-27B, C). Stimulation mit 10^{-9} M VIP inhibierte die Kathepsin K-Aktivität in Kulturen von Osteoklasten aus den KMM von arthritischen und NaCl-behandelten Ratten, während 10^{-11} M VIP nur Kulturen von Osteoklasten arthritischer Tiere signifikant beeinflusste. Eine genauere Analyse des VIP-Einflusses auf die Kathepsin K-Aktivität im CIA-Zeitverlauf, offenbarte, dass die Enzymaktivität von Kathepsin K in Osteoklastenkulturen von Kontrolltieren 15 Tage nach NaCl-Behandlung durch 10^{-11} M VIP und 20 und 40 Tage nach NaCl-Behandlung durch 10^{-9} M VIP, verglichen mit der unstimulierten Osteoklastenkultur, signifikant reduziert wurde. In den Überständen der Osteoklastenkulturen, die 15 Tage nach Immunisierung aus den KMM von CIA-Tieren differenziert wurden, wurde nach Stimulation mit 10^{-9} M VIP signifikant weniger Kathepsin K-Substrat umgesetzt im Vergleich zu unstimulierten Kulturen. Sowohl 10^{-9} als auch 10^{-11} M VIP hemmten 20 Tage nach Immunisierung die Kathepsin K-Aktivität (Abb. 4-27F). Stimulation mit 10^{-6} M NA reduzierte die Kathepsin K Aktivität im Kulturüberstand von Osteoklasten aus arthritischen und Kontrolltieren, während 10^{-8} M NA ausschließlich die Enzymaktivität in Kulturen von Osteoklasten aus dem Knochenmark von arthritischen Tieren hemmte (Abb. 4-27C). Bei näherer Betrachtung der unterschiedlichen CIA-Phasen wurde deutlich, dass ein Einfluss von NA nur auf die Kathepsin K-Aktivität im Kulturüberstand von Osteoklasten, die aus KMM arthritischer Tiere differenziert wurden, zu beobachten war. So hemmte 10^{-6} M NA die Enzymaktivität 10, 15 und 20 Tage nach Immunisierung, während der Einfluss von 10^{-8} M nur an Tag 20 signifikant wurde (Abb. 4-27G).

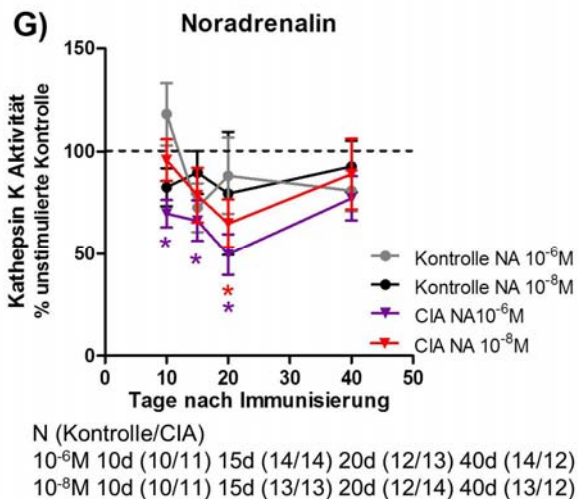
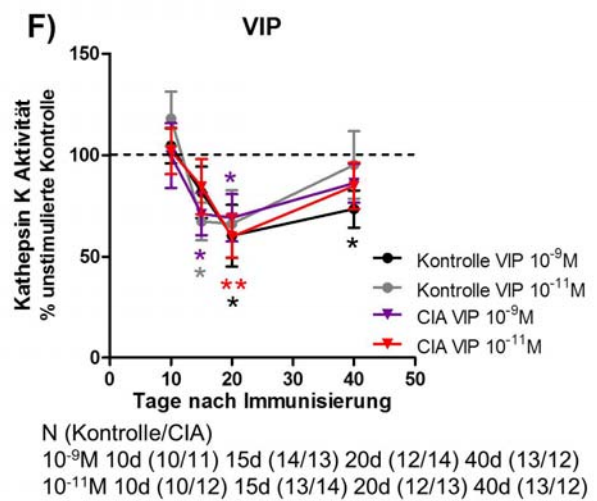
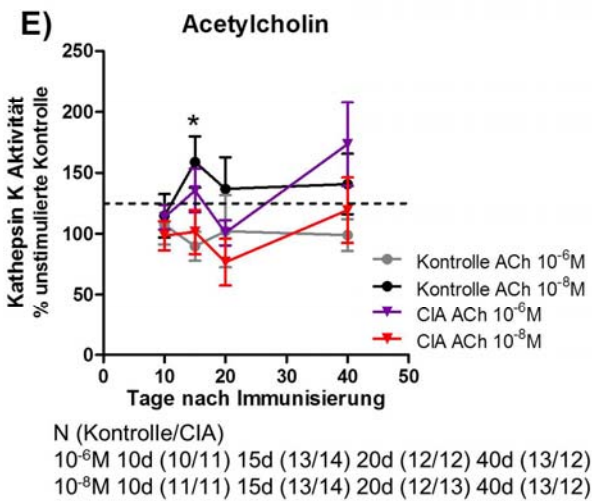
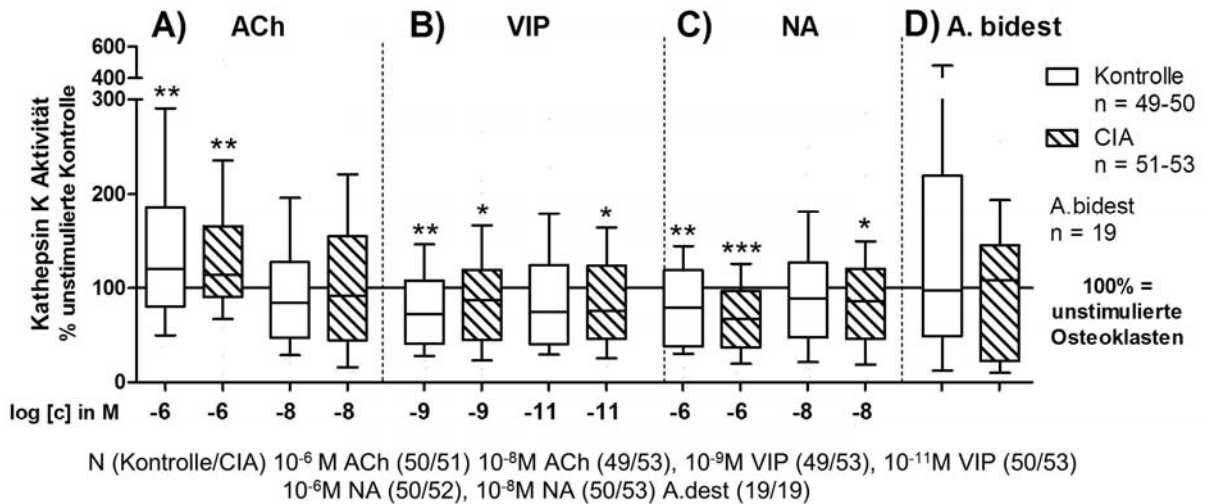


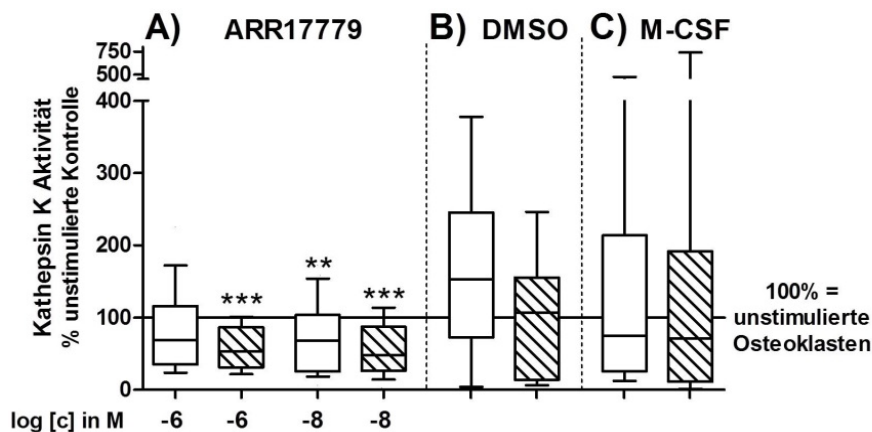
Abbildung 4-27: Einfluss von ACh, NA und VIP auf die Kathepsin K-Aktivität von Osteoklasten.

A-D) Der Einfluss von ACh (A), VIP (B) und NA (C) sowie des Lösungsmittels A.dest (D) auf die Kathepsin K-Aktivität im Überstand von Osteoklasten, die aus CIA-KMM oder Kontroll-KMM generiert wurden, ist prozentual zur Kathepsin K-Aktivität der entsprechenden unstimulierten Kulturen (100%) dargestellt.

E-G stellt den Einfluss von ACh (E), VIP (F) und NA (G) auf die Kathepsin K-Aktivität von Osteoklasten, bezogen auf die jeweiligen unstimulierten Kulturen, im Zeitverlauf der CIA dar. Datenpunkte repräsentieren den

Mittelwert \pm SEM. Boxplots umfassen das 10te bis 90te Perzentil der Datensätze. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Um zu untersuchen, ob Stimulation des $\alpha 7$ nACh-Rezeptors einen Einfluss auf die Kathepsin K-Aktivität hat, wurden Osteoklastenkulturen mit dem spezifischen Agonist ARR17779 stimuliert. Abbildung 4-28A zeigt den Einfluss von ARR17779 auf die Kathepsin K-Aktivität von Osteoklastenkulturen, die aus den KMM arthritischer und NaCl-behandelter Ratten differenziert wurden, im Vergleich zu ihren jeweiligen unstimulierten Kulturen. Stimulation mit 10^{-6} M ARR17779 hemmte die Kathepsin K-Aktivität in Osteoklastenkulturen von CIA-Tieren, während für Kulturen von NaCl-behandelten Tieren dieser Effekt nur tendenziell zu beobachten war. Dahingegen wurde durch 10^{-8} M ARR17779 im Osteoklastenüberstand von CIA- und Kontroll-Kulturen der Substratumsatz durch Kathepsin K signifikant gehemmt. Lösungsmittelleffekte durch DMSO waren nicht erkennbar (Abb. 4-28B). Auffällig war, dass in Kulturen, die nur mit M-CSF, aber nicht mit RankL, differenziert wurden, keine deutlich niedrigere Enzymaktivität von Kathepsin K festgestellt wurde (Abb. 4-28C).



N (Kontrolle/CIA) 10^{-6} M ARR17779 (34/34) 10^{-8} M ARR17779 (37/35) DMSO (17/18) M-CSF (12/13)

Abbildung 4-28: Einfluss von ARR17779, DMSO und M-CSF auf die Kathepsin K-Aktivität von Osteoklasten.

A und B zeigen den Einfluss von ARR17779 und DMSO auf die Kathepsin K-Aktivität im Überstand von Osteoklasten, die aus CIA-KMM oder Kontroll-KMM generiert wurden, prozentual zur Kathepsin K-Aktivität der entsprechenden unstimulierten Kulturen (100%).

C vergleicht die Kathepsin K-Aktivität in Überständen von Osteoklasten aus arthritischen und NaCl-behandelten Ratten, die nur mit M-CSF behandelt wurden mit den entsprechenden M-CSF/RankL-behandelten (unstimuliert, 100%) Zellkulturüberständen.

Boxplots umfassen das 10te bis 90te Perzentil der Datensätze. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.4.2 Resorption von knochenähnlicher Matrix

Um die aktive Resorptionskapazität von Osteoklastenkulturen, die aus KMM von immunisierten und NaCl-behandelten Ratten differenziert wurden, zu untersuchen, wurde mittels Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium zu SAOS-2 Zellen, eine knochenähnliche Matrix generiert. Nach der Aussaat der KMM auf der Matrix, die sowohl proteinogene als auch kristalline Anteile enthält und damit der natürlichen Knochenmatrix sehr ähnlich ist, wurde nach Entstehung von reifen Osteoklasten die Matrix resorbiert (Abb. 4-29A). Um aktiv Matrix zu resorbieren, bildet sich an der basolateralen Membran der Osteoklasten der sogenannte Aktinring, der für die feste Anheftung an die Matrixoberfläche und die anschließende Resorption notwendig ist (Abb. 4-29 B).

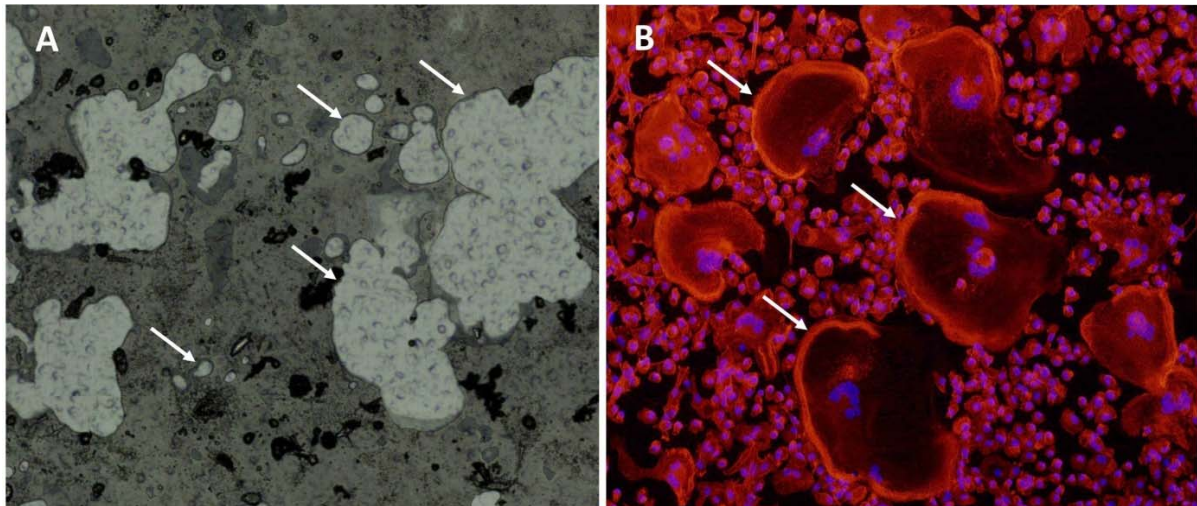


Abbildung 4-29: Resorption von knochenähnlicher Matrix und Aktinring-Bildung.

Abbildung A zeigt beispielhaft Resorptionsflächen von Osteoklasten, die 20 Tage nach NaCl-Behandlung aus den KMM von DA Ratten generiert wurden, auf SAOS-generierter, knochenähnlicher Matrix (weiße Pfeile). 100fache Vergrößerung. B zeigt Phalloidin-Alexa546-gefärbte Aktinringe (weiße Pfeile) von Osteoklasten, die 20 Tage nach NaCl-Behandlung aus den KMM von DA Ratten generiert wurden. 200fache Vergrößerung.

Durch CIA wurde keine messbare Veränderung in der Resorptionsaktivität von Osteoklasten aus arthritischen Tieren gegenüber der Aktivität von Osteoklasten aus Kontrolltieren induziert (Abb. 4-30A). Im Zeitverlauf der CIA zeigt sich dagegen eine signifikant verstärkte Resorptionsaktivität auf knochenähnlicher Matrix von Osteoklasten, die aus KMM chronisch kranker CIA-Ratten differenziert wurden (Abb. 4-30B). Die Genexpression von Markergenen für die Osteoklastenaktivität wie Kathepsin K, MMP-9, TRAP, Kohlensäureanhydrase II (CarII) und einer Untereinheit der V-ATPase, Tcirg1, wurde durch CIA signifikant inhibiert (Abb. 4-30C), obwohl die Effekte vorrangig auf die Zeitpunkte 10 und 15 Tage nach

Immunisierung beschränkt waren (Tabelle 4-4). Ausgenommen war die Genexpression von TRAP, die ebenfalls 20 Tage nach Immunisierung, reduziert war und Tcigr, dessen Genexpression ausschließlich 40 Tage nach Immunisierung reduziert war (Tabelle 4-4).

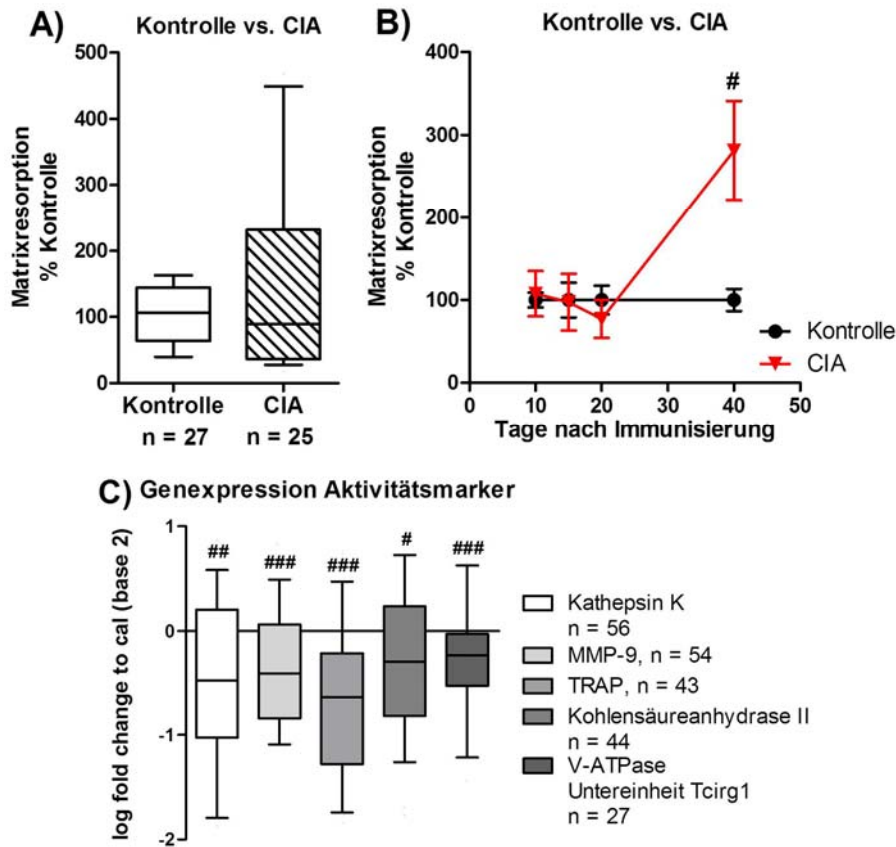


Abbildung 4-30: Einfluss von CIA auf die Resorption knochenähnlicher Matrix und die Genexpression von Aktivitätsmarkern.

A stellt die resorbierte Fläche von Osteoklasten, die aus CIA-KMM generiert wurden, prozentual zur resorbierten Fläche von Osteoklasten, die aus KMM von Kontrolltieren (100%) generiert wurden, dar. B stellt die resorbierte Fläche von Osteoklasten, die aus CIA-KMM generiert wurden, prozentual zur resorbierten Fläche von Osteoklasten, die aus KMM von Kontrolltieren (100%) generiert wurden, im

Zeitverlauf der CIA dar. N (Kontrolle/CIA) = 10d (6/6), 15d (6/6), 20d (7/7), 40d (8/8).

C Genexpressionsdaten der Aktivitätsmarker von Osteoklasten, die aus KMM arthritischer Tiere generiert wurden sind relativ zu Genexpression von Osteoklasten aus den KMM NaCl-behandelter Ratten dargestellt (Null-Linie). Die Expression der mRNA der Aktivitätsmarker wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert und als *log fold change* zum Kalibrator (Basis 2) dargestellt.

Boxplots umfassen das 10te bis 90te Perzentil der Datensätze. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. [#]p<0,05, ^{##}p<0,01, ^{###}p<0,001.

Stimulation mit ACh, NA und VIP hatte keinen Einfluss auf die Resorptionsaktivität von Osteoklasten aus CIA- und Kontrolltieren in Relation zu den jeweiligen unstimulierten Kulturen (Abb. 4-31A, B, C). Auch nach Stimulation mit ARR17779, dem Agonisten für die $\alpha 7$ nACh-Rezeptoruntereinheit, blieb die Resorptionskapazität unverändert (Abb. 4-31E). Auffällig war ebenfalls, dass in Kulturen, die nur in Gegenwart von M-CSF, aber nicht dem Osteoklastendifferenzierungsfaktor RankL, differenziert wurden, die Resorptionskapazität ebenfalls unverändert gegenüber der Resorptionskapazität von unstimulierten, M-CSF/RankL-differenzierten Kulturen war (Abb. 4-31G).

Ergebnisse

	10 Tage n. I.	15 Tage n. I.	20 Tage n. I.	40 Tage n. I.
Kathepsin K (n=12-16)	*-0,52±0,21	** -1,09±0,29	-0,50±0,23	-0,11±0,15
MMP-9 (n=12-15)	***-0,64±0,10	*-0,60±0,21	-0,20±0,20	-0,21±0,14
TRAP (n=10-12)	-0,24±0,40	*-0,77±0,27	** -0,81±0,18	-0,19±0,16
Car II (n=10-12)	** -0,54±0,14	*-0,51±0,21	-0,48±0,29	-0,02±0,16
Tcirg1 (n=6-8)	-0,06±0,18	-0,22±0,35	-0,52±0,24	*-0,25±0,06

Tabelle 4-4: Genexpression von Aktivitätsmarkern im Zeitverlauf von CIA.

Genexpressionsdaten von CIA-KMM sind relativ zur Expression von Kontroll-KMM (=0) wiedergegeben. Deren Expression wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert und als Mittelwert \pm SEM des *log fold change* zum Kalibrator (Basis 2) dargestellt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. CarII – Kohlensäureanhydrase II, MMP-9 – Matrixmetalloproteinase 9, n.I. – nach Immunisierung, TRAP – tartrat-resistente saure Phosphatase

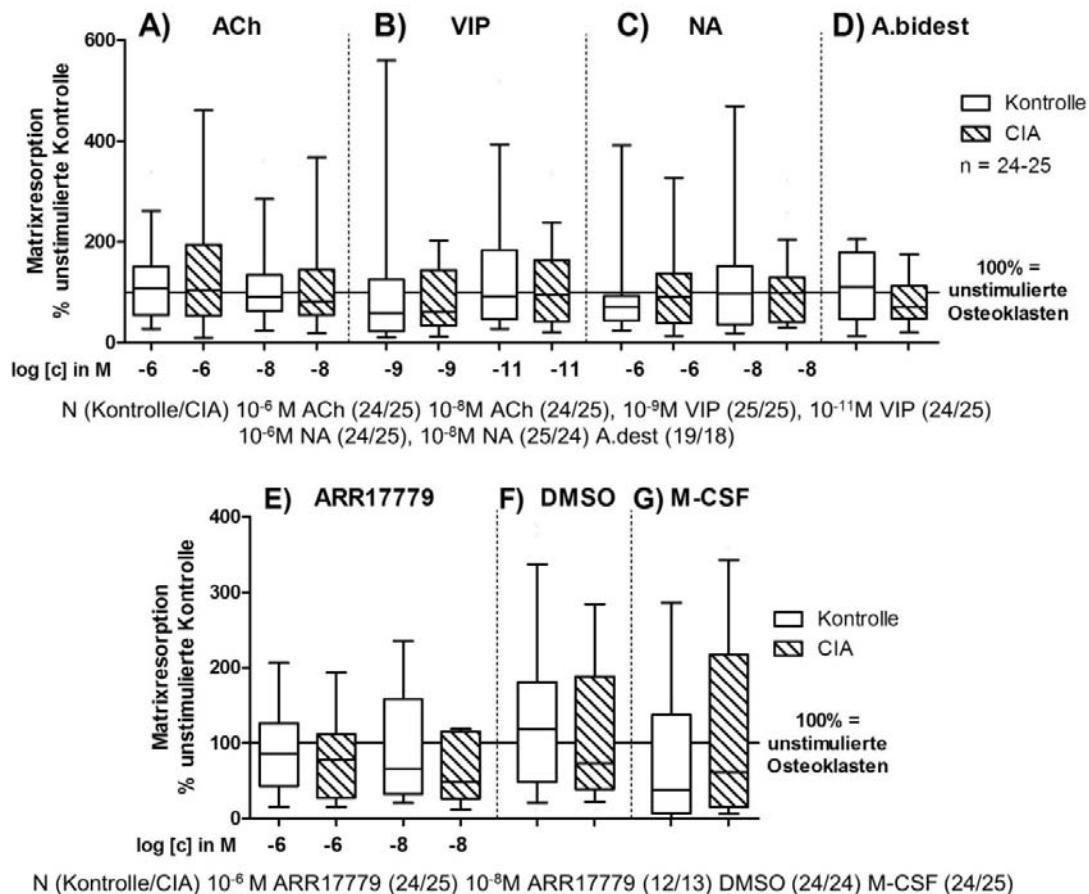


Abbildung 4-31: Der Einfluss von ACh, NA, VIP und ARR17779 auf die Resorption knochenähnlicher Matrix.

A-G zeigt den prozentualen Anteil der von Osteoklasten resorbierten Fläche, die mit den verschiedenen Stimuli inkubiert wurden, bezogen auf die resorbierte Matrixfläche der entsprechenden unstimulierten Osteoklasten-Kulturen (100%). Ergebnisse für ACh sind unter (A), für VIP unter (B), für NA unter (C) und für das verwendete Lösungsmittel A.dest unter (D) dargestellt. Ergebnisse für die Stimulation mit ARR17779 und dem entsprechenden Lösungsmittel DMSO sind unter E bzw. F dargestellt. Ergebnisse der Kontrollkultur, die nur in Gegenwart von M-CSF kultiviert wurde sind unter G dargestellt. Boxplots umfassen das 10te bis 90te Perzentil der Datensätze.

4.3.5 Einfluss cAMP-assoziierter Signalwege auf Differenzierung und Aktivität

Da die Stimulation mit NA und VIP, über cAMP-assozierte Signalwege, während der Osteoklastogenese hemmend auf die Kathepsin K Enzymaktivität von Osteoklasten wirkte und partiell (10^{-6} M NA) auch die Differenzierung von Osteoklasten gehemmt wurde, sollte weiterhin untersucht werden, ob ein spezifischer Signalweg für diese Beobachtung verantwortlich ist. Um zu untersuchen, ob tatsächlich cAMP-Signale für den hemmenden Einfluss von NA und VIP auf die Kathepsin K-Aktivität und Osteoklastenanzahl verantwortlich sind, wurden KMM von arthritischen und Kontrolltieren in Gegenwart des Adenylatzyklase-Aktivators NKH 477 differenziert und die Anzahl der entstandenen Osteoklasten und die Kathepsin K-Aktivität in den entsprechenden Überständen analysiert (Abb. 4-32).

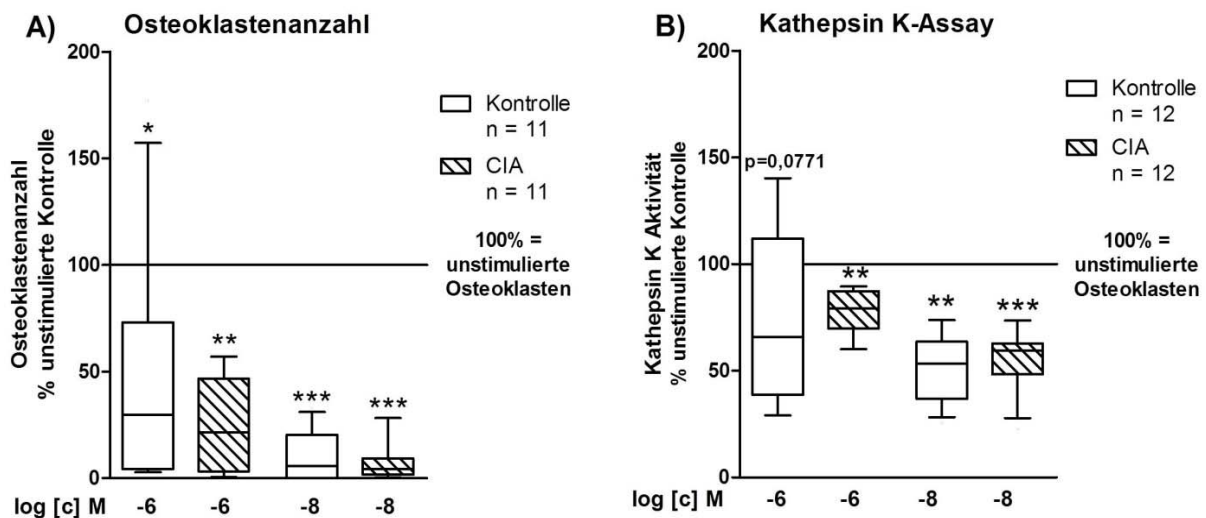


Abbildung 4-32: cAMP-Einfluss auf Osteoklastendifferenzierung und Kathepsin K-Aktivität.

A stellt die Anzahl der in Gegenwart von NKH477 differenzierten Osteoklasten, aus KMM-Kulturen arthritischer und NaCl-behandelter Ratten, prozentual zur Osteoklastenanzahl der entsprechenden unstimulierten Kulturen (100%) dar.

B stellt die Kathepsin K-Aktivität in den korrespondierenden Zellkulturüberständen als prozentualen Anteil von NKH477-stimulierten Osteoklastenkulturen immunisierter und NaCl-behandelter Ratten, zur Kathepsin K-Aktivität der jeweiligen unstimulierten Kultur (100%) dar.

Boxplots umfassen das 10te bis 90te Perzentil der Datensätze. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Stimulation mit 10^{-6} und 10^{-8} M NKH 477 führten zu einer signifikanten Inhibition der Osteoklastendifferenzierung im Vergleich zu unstimulierten Kulturen, unabhängig ob KMM aus NaCl- oder Kollagen Typ II-behandelten Ratten stimuliert wurden (Abb. 4-32A). Der Einfluss von 10^{-8} M NKH 477 war dabei deutlich stärker als der von 10^{-6} M NKH 477. Ähnliche Beobachtungen konnten für die Kathepsin K-Aktivität im Zellkulturüberstand der korrespondierenden Osteoklastenkulturen gemacht werden. 10^{-6} M NKH 477 hemmte die

Kathepsin K-Enzymaktivität in den CIA-Osteoklastenüberständen signifikant, aber tendenziell auch die entsprechenden Kulturen von Osteoklasten aus Kontrolltieren. Dahingegen führte Differenzierung in Gegenwart von 10^{-8} M NKH 477 zu einer deutlichen Hemmung der Kathepsin K-Aktivität in Osteoklastenkulturen aus KMM immunisierter und NaCl-behandelter Ratten (Abb. 4-32B).

5 Diskussion

In RA stellen Makrophagen eine der wichtigsten Zellpopulationen in der Entzündungsregion des Synovialgewebes dar, da sie hohe Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine sezernieren und vor allem, da sie die Vorläuferzellen für Osteoklasten darstellen, die für die progressive Gelenkzerstörung durch erosiven Knochenabbau verantwortlich sind. Makrophagen entstammen der hämatopoetischen Stammzell (HSZ)-Linie des Knochenmarks. Die Untersuchungen dieser Studie sollten zeigen, dass in CIA nicht nur lokale Effekte im Synovialgewebe das Verhalten von Makrophagen beeinflussen können, sondern schon auf Ebene von Knochenmark-Vorläuferzellen Mechanismen induziert werden, die metabolische Eigenschaften wie Apoptose, Proliferation oder Adhäsion modulieren. Bezüglich der Pathogenese von RA gibt es zwei gegensätzliche Hypothesen. Eine geht von lokalen synovialen Veränderungen als Initiator der pathophysiologischen Prozesse in RA aus, während die andere Hypothese Veränderungen im Knochenmark als Ursache der nachfolgenden destruktiven Ereignisse im Gelenk ansieht (238). Für die Knochenmark-Theorie spricht, dass vorhandene Knochenmarködeme gute Marker für aggressive Krankheitsverläufe mit fortschreitender Knochenerosion darstellen (239) und diese Knochenmarködeme mit einer verstärkten Infiltration von Makrophagen, Plasmazellen, B-Zellen und vor allem Osteoklasten im Knochenmark korrelieren (240). Expression von degradativen Enzymen, wie MMP-9 und Kathepsin K, sowie kolokalisierte Genexpression von TNF und IL-1 β mit CD68⁺-Zellen (Monozyten/Makrophagen) in subchondralen Knochenregionen von RA-Patienten (241), sprechen ebenfalls für die Theorie einer initialen Osteitis, die sich letztendlich als synoviale Entzündung und RA manifestiert. Weitere Indikatoren von RA als Knochenmark-Erkrankung ist eine Erhöhung myeloider Vorläuferzellen in der HSZ-Population (242), eine reduzierte Proliferation und erhöhte Immunseneszenz von HSZ (243), sowie die Therapierfolge, die in einigen RA-Patienten durch Stammzelltransplantation erzielt werden konnten (zusammengefasst in (244)).

5.1 Einfluss von CIA auf metabolische Eigenschaften von Knochenmark-Makrophagen

Um den Einfluss von CIA auf Knochenmark-Makrophagen zu untersuchen, wurde Knochenmark aus Ratten in verschiedenen Erkrankungsstadien und den entsprechenden Kontrolltieren isoliert und die Makrophagenpopulation in Gegenwart von M-CSF, über ihre Fähigkeit an unbehandelte Plastikoberflächen zu adhären, separiert (227). Beim Vergleich

der Makrophagenanzahl aus immunisierten Tieren mit der korrespondierenden Anzahl aus NaCl-behandelten Tieren im Zeitverlauf der Arthritis, wurde zum akuten Arthritiszeitpunkt (assoziiert mit hochgradiger Gelenkentzündung) ein deutlicher Rückgang der Makrophagenanzahl festgestellt. Um zu untersuchen, ob diese Reduktion der Zellzahl auf Veränderungen in der Makrophagenpopulation des Knochenmarks beruht, oder ob andere Defekte im Makrophagenverhalten verantwortlich waren, wurde die Anzahl CD11b-positiver Zellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen) und EMR1-positiver Zellen (Pan-Makrophagenmarker) im nativen Knochenmark mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Interessanterweise war die Anzahl der CD11b- und EMR1-positiven Zellen im nativen Knochenmark akut arthritischer Tiere, verglichen mit den Kontrolltieren, signifikant erhöht. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in anderen murinen Arthritisstudien gemacht, die eine Erhöhung des Anteils der myeloiden Zellpopulation an der Gesamtzahl der Knochenmarkzellen feststellen konnten (242, 245). Mit Progression der Arthritis zur chronischen Phase und dem Abklingen der Entzündung wird diese Verschiebung der Anteile der HSZ in Richtung myeloide Population wieder aufgehoben. Die vorübergehende Erhöhung der Anzahl myeloider HSZ spiegelt den erhöhten Bedarf von Immunzellen während akuter Entzündungsprozesse wieder. Neben der Erhöhung des Anteils der myeloiden Population im Knochenmark konnte zum akuten Arthritiszeitpunkt auch eine signifikante Reduktion von CD90-positiven Zellen im Knochenmark arthritischer Tiere gemessen werden. CD90 oder Thy-1 wird zusammen mit CD73 und CD105 als Marker für mesenchymale Stammzellen beschrieben (230), wird aber z.B. auch von Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten der Synovialmembran exprimiert sowie von dermalen Fibroblasten (246) und aktivierten Endothelzellen (247). Die Literatur zu CD90/Thy-1 und Arthritis beschränkt sich auf die Expression als Marker für Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten und als erhöhten löslichen Marker in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten (247, 248). Die Reduktion in der Anzahl CD90-positiver Knochenmarkzellen im akuten Arthritisstadium stellt einen neuen und interessanten Befund dar, der in der aktuellen Literatur bisher nicht beschrieben wurde. Möglicherweise migrieren vermehrt CD90-positive Zellen aus dem Knochenmark in das entzündete Synovialgewebe oder andere Gewebe, entweder um (1) den durch die Entzündung verursachten Gewebedefekten entgegenzustehen und Reparaturmechanismen zu induzieren, oder (2) um weitere invasive synoviale Fibroblasten zu induzieren und die Gelenkzerstörung weiter voran zu treiben.

Die über Plastikadhärenz isolierten KMM wurden ebenfalls auf die Expression der Makrophagenmarker CD11b, EMR1 und CD90 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Analysen konnten zeigen, dass die Methode eine hoch angereicherte Population von CD11b- und EMR1-positiven Zellen hervorbrachte, die für die weiteren Untersuchungen verwendet wurde. Die isolierte Population war negativ für CD90 und somit waren keine messbaren Verunreinigungen von mesenchymalen Stammzellen oder Fibroblasten enthalten.

Die reduzierte Anzahl von KMM nach Separation über Plastikadhäsion im akuten Arthritisstadium kann prinzipiell durch Änderungen in Eigenschaften wie Apoptose, Proliferation und Adhäsion verursacht werden. Daher wurde in den nächsten Schritten der vorliegenden Arbeit nun der Einfluss von CIA auf diese Eigenschaften untersucht.

Durch Induktion von CIA wurde die Adhäsionskapazität von KMM an unbehandeltes Zellkulturplastik in der akut inflammatorischen Phase, 20 Tage nach Immunisierung, signifikant reduziert. Veränderungen in der Plastikadhärenz von Makrophagen wurden auch in Patienten mit systemischem Lupus erythematoses und RA beobachtet. Diese Patienten waren jedoch teilweise unter Kortikosteroid-Behandlung und so kann ein Einfluss der Behandlung auf die Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden (249). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie dagegen wurden in KMM aus DA Ratten generiert, die keinerlei therapeutische Behandlung erhalten haben und so die sichere Aussage ermöglichen, dass CIA, durch bisher unbekannte Mechanismen, die Adhäsionskapazität von Makrophagen an Plastik inhibiert. Da die Knochenmark-Makrophagen über Plastikadhärenz aus dem Knochenmark isoliert wurden, liegt in dieser Veränderung vermutlich die Ursache für die verringerte Anzahl von KMM akut arthritischer Tiere nach Isolation aus dem Knochenmark. Obwohl dieser Befund große Auswirkungen auf *in vitro*-Experimente mit Knochenmark-Makrophagen aus akut arthritischen Tieren bzw. Patienten haben kann, ist die Bedeutung für die *in vivo*-Situation weniger klar. Aus diesem Grund wurden die Adhäsionsexperimente erweitert und die Adhärenz von KMM arthritischer und NaCl-behandelter Ratten an spezifische Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Kollagen Typ I, Fibronectin und Laminin, untersucht, da Makrophagen *in vivo* über Interaktion mit diesen Molekülen agieren. In Studien mit peripheren Blutmonozyten (250) und synovialen Fibroblasten (251) von RA-Patienten, wurde eine erhöhte Integrinexpression und eine verstärkte Anhaftung an Komponenten der extrazellulären Matrix beobachtet. Im Gegensatz dazu konnten wir in unseren Experimenten mit KMM eine signifikante Reduktion der Adhäsion an Kollagen I und Fibronectin durch Kollagen Typ II-induzierte Arthritis im chronischen Arthritisstadium,

sowie tendenziell ebenfalls im akuten Arthritisstadium, feststellen. Die Adhäsion der CIA-KMM an Laminin war in der chronischen CIA-Phase ebenfalls tendenziell beeinträchtigt. Bezüglich der *in vivo*-Bedeutung dieser Beobachtung könnte nach Induktion von CIA eine Migration von KMM via Komponenten der extrazellulären Matrix durch unbekannte Mechanismen inhibiert werden. Somit könnte ein erneutes Aufflammen der Entzündungsreaktion in der chronischen CIA-Phase durch eine reduzierte Makrophageninfiltration verhindert werden. Parallel wurde die Expression der Integrine CD29 (Integrin $\beta 1$) und CD51/CD61 (Integrin $\alpha v \beta 3$), die die Adhäsion von Makrophagen an ECM-Komponenten vermitteln, mittels Durchflusszytometrie untersucht. Für CD29 konnten keine Unterschiede in der Expression zwischen KMM aus arthritischen und NaCl-behandelten Kontrolltieren festgestellt werden, während CD51/CD61 in unserem System nicht detektierbar war. Der verwendete Antikörper für die Detektion von CD29 war nicht speziell gegen die aktive Konformation des Integrins gerichtet. Somit kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob CIA einen Einfluss auf den Aktivierungsstatus des Integrins hatte und dadurch Unterschiede in der Adhäsion an die Matrixkomponenten verursacht wurden. Möglicherweise spielen andere Rezeptoren auf der Zelloberfläche von KMM eine Rolle oder CIA induziert Veränderungen in der intrazellulären Signalweiterleitung oder, wie oben erwähnt, der Aktivierungsstatus von Integrinen wird durch CIA moduliert.

Neben den Einflüssen auf die Adhäsion hatte die Induktion von CIA einen stark hemmenden Effekt auf die Proliferation von KMM, der tendenziell schon 10 Tage nach Immunisierung zu beobachten war, sich dann aber signifikant bis in die chronische Phase der CIA fortsetzte. Überraschenderweise waren zum akuten Zeitpunkt der CIA keine Unterschiede in der Proliferationskapazität von KMM aus arthritischen und NaCl-behandelten Ratten messbar. In Zusammenhang mit der gemessenen Reduktion der Adhäsion 20 Tage nach Immunisierung kann man deshalb von einer erhöhten Proliferation von CIA-KMM in der akuten Phase ausgehen. Eine erhöhte Proliferationsrate in akuten Entzündungsvorgängen reflektiert den erhöhten Bedarf von Immunzellen, um die Ursache der Entzündung zu bekämpfen. So wurde auch in anderen akuten lokalen Entzündungsreaktionen eine stark erhöhte Proliferationsrate von Makrophagen beobachtet, möglicherweise um eine schnelle Wiederherstellung der Homöostase zu erreichen (252). Andererseits wurde in RA eine Reduktion der Proliferation von CD34⁺-Stammzellen beobachtet, die durch frühe Induktion von Immunseneszenz verursacht wurde (243). Weiterhin wurde in Milzzellen und peripheren Blutmonozyten von Ratten mit Adjuvant-induzierter Arthritis eine reduzierte proliferative Antwort nach

mitogener Stimulation vier Tage nach Arthritisinduktion beobachtet (253). Diese widersprüchlichen Beobachtungen können durch unterschiedliche Bedingungen in den jeweiligen Arthritisphasen erklärt werden. Möglicherweise wird direkt nach Arthritisinduktion die proliferative Kapazität der HSZ, und damit auch die Zellreserve für Immunzellen, reduziert. Durch hohe Konzentrationen pro-inflammatorischer und pro-proliferativer Faktoren wird dieser Effekt in der akuten Arthritisphase überlagert, was zu einem starken Proliferationsschub führt, der in der chronischen Phase durch unbekannte Mechanismen inhibiert wird. Die Analyse der Zellzyklusphasen von KMM aus immunisierten und NaCl-behandelten Ratten zeigte dagegen keine Unterschiede und somit sind in dieser Arbeit keine Aussagen über den Einfluss von CIA auf die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Änderung der Proliferationsrate von CIA-KMM möglich.

Bei der Betrachtung der Caspase 3/7 Aktivität von KMM aus arthritischen und NaCl-behandelten Ratten fällt auf, dass CIA zu einer Hemmung der Apoptose der KMM aus arthritischen Tieren führt, die aber bei genauerer Betrachtung keiner spezifischen CIA-Phase zugeordnet werden kann. Stattdessen ist in der chronischen Phase eher eine Verstärkung der Caspase 3/7-Aktivität in CIA-KMM im Vergleich zu den Kontroll-KMM zu beobachten. Die reduzierte Apoptose-Aktivität, die in RA eine der Ursachen für die anhaltende Persistenz der Erkrankung darstellt, wird scheinbar durch spezielle lokal exprimierte Faktoren des synovialen Gewebes verursacht (254, 255), die aber auch einen Einfluss auf die Vitalität von KMM nehmen können. Die verstärkte Apoptoseinduktion nach M-CSF- und Serum-Deprivation in der chronischen CIA-Phase könnte verhindern, dass erneute Entzündungsprozesse durch Makrophagenaktivierung initiiert werden.

Durch Kollagen-induzierte Arthritis werden zelluläre Eigenschaften von KMM wie Proliferation und Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen I und Fibronectin moduliert, die *in vivo* als regulatorische Mechanismen gegen eine übermäßige Aktivierung dieser Zellen wirken würden. Die Reduktion des Adhäsionsvermögens an Plastikoberflächen in der akuten Phase der Arthritis dagegen kann Daten von *in vitro*-Experimenten beeinflussen. Die effektive Zellzahl der eingesetzten CIA-KMM würde durch die reduzierte Adhäsion stark abweichen und somit können Assayergebnisse in Relation zur Kontrolle verfälscht werden.

5.2 Einfluß von sympathischer Neurotransmitterstimulation auf metabolische Eigenschaften von Knochenmark-Makrophagen

Da Untersuchungen zum Einfluss der sympathischen Neurotransmitter NA, ACh und VIP auf KMM im Kontext der Kollagen-induzierten Arthritis ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit waren, wurde initial die Expression verschiedener Rezeptoren für die jeweiligen Neurotransmitter auf mRNA- und für ausgewählte Rezeptoren auch auf Proteinebene untersucht. Es konnte eine große Vielzahl verschiedener Rezeptoren auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Mittels qualitativer Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung war kein Unterschied in der Rezeptorexpression und -lokalisation auf KMM arthritischer und NaCl-behandelter Ratten feststellbar. Aufgrund der Rezeptorvielfalt kann die Stimulation mit den Neurotransmittern verschiedene Signalwege induzieren, die sich gegenseitig ergänzen oder auch aufheben können. Obwohl durch CIA keine offensichtlichen Änderungen in der Expression bzw. Lokalisation der Rezeptoren verursacht wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die intrazelluläre Signalkaskade verändert wurde und somit andere Effektormechanismen wirksam werden können.

Abhängig vom verwendeten Assay wurden unterschiedliche Effekte von NA, ACh und VIP beobachtet. Stimulation mit NA konnte nur die Adhäsion von KMM aus NaCl-behandelten Tieren an Plastik beeinflussen, mit einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Adhäsion (10^{-6}M) 10 Tage nach NaCl-Behandlung und einer verstärkten Adhäsion (10^{-8}M) 40 Tage nach NaCl-Behandlung. Ein ähnlicher zeitabhängig veränderlicher Einfluss von NA auf die Adhäsion an Plastik, wurde von Ortega et al. in peritonealen Makrophagen beobachtet und mit dem Einfluss von Alterseffekten assoziiert (256). Für VIP und ACh dagegen, wurden nur Effekte auf KMM aus arthritischen Tieren beobachtet. Parallel zur Induktion von CIA hemmte ACh die Adhäsion von CIA-KMM, während in der akuten und chronischen Phase VIP die Plastikadhäsion der CIA-KMM verstärkte. Es gibt zwar keine spezifischen Daten aus der Literatur zum Einfluss von ACh auf die Adhäsionskapazität von Makrophagen, aber Reardon et al. konnten eine reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen nach ACh-Stimulation feststellen, die die Migration von Neutrophilen in die Entzündungsregion inhibierte. Die Studie zeigte, dass der Effekt über muskarinerge ACh-Rezeptoren vermittelt wurde (257). Übereinstimmend mit unseren Daten, konnte von de la Fuente et al. gezeigt werden, dass Stimulation von peritonealen Makrophagen mit 10^{-9}M VIP zu einer klaren Verstärkung der Adhäsion führte (258). Die Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix wurde durch Stimulation mit NA, ACh und VIP selektiv beeinflusst.

ACh und 10^{-8} M NA hatten keinen Einfluss auf die Matrixadhäsion. Einzig die Adhäsion an Kollagen I und Laminin wurde durch 10^{-6} M NA 40 Tage nach NaCl-Behandlung signifikant reduziert. Tendenziell hemmte 10^{-9} M VIP in Kontroll-KMM die Adhäsion an Kollagen I 20 Tage und an Laminin 40 Tage nach NaCl-Behandlung. CIA-KMM aus chronisch arthritischen Ratten reagierten, im Gegensatz zu Kontroll-KMM, anerg auf NA-Stimulation bezüglich der Adhäsion an Plastik, Kollagen I und Laminin. Diese ausbleibende Reaktion auf NA würde *in vivo* zu einer verstärkten Adhäsion von KMM an ECM-Bestandteile führen und damit die Migration von KMM begünstigen. Stimulation mit VIP führt nur nach Induktion von Arthritis zu einer Veränderung der Plastikadhäsion und könnte so die Anergie der CIA-KMM auf NA-Stimulation kompensieren. Die im Zeitverlauf der Erkrankung veränderten Einflüsse von NA, ACh und VIP auf Adhäsionsprozesse in Abhängigkeit vom jeweiligen Substrat werden vermutlich durch hier nicht untersuchte, CIA-assoziierte Mechanismen induziert.

Stimulation mit 10^{-6} M und 10^{-8} M NA führte 40 Tage nach NaCl-Behandlung zu einer starken Hemmung der Proliferation von Kontroll-KMM, während in CIA-KMM nur 10^{-6} M NA zu einer Hemmung der Proliferation führte. In Knochenmarkkulturen, die in Gegenwart von M-CSF kultiviert wurden und mit 10^{-6} M und 10^{-8} M NA, also über β - bzw. α -Adrenozeptoren, stimuliert wurden, zeigte die Makrophagenpopulation eine gehemmte Proliferationskapazität (259), analog zu den Beobachtungen unserer Studie. Im Gegensatz dazu wurde durch ACh und VIP die Proliferation von KMM, die 20 Tage nach NaCl-Behandlung isoliert wurden, verstärkt, während CIA-KMM zum akuten Arthritiszeitpunkt eine verringerte Proliferation nach Stimulation mit ACh und VIP aufwiesen. In der chronischen CIA-Phase wurde durch ACh die Proliferation in CIA- und Kontroll-KMM gehemmt, durch VIP nur in Kontroll-KMM. Sowohl ACh als auch VIP werden vorrangig als Mediatoren anti-inflammatorischer Effekte beschrieben (260, 261), was auch durch die Hemmung der Proliferation der Kontroll-KMM in unseren Experimenten unterstützt wird, aber CIA führt zu einer Dämpfung dieser anti-inflammatorischen Effekte. Die Vermittlung der anti-inflammatorischen Effekte von ACh werden zumeist mit dem $\alpha 7$ nACh-Rezeptor auf Makrophagen assoziiert, der die Expression pro-inflammatorischer Zytokine inhibiert (182). Zu unserer Überraschung konnten wir die Expression des $\alpha 7$ nAChR auf den Rattenmakrophagen nur in vereinzelten Experimenten und nur sehr schwach auf mRNA-Ebene nachweisen. Parallel wurden in dieser Arbeit Experimente mit dem spezifischen $\alpha 7$ nAChR Agonisten ARR17779 durchgeführt, der aber keine Effekte auf metabolische Eigenschaften von Knochenmark-Makrophagen hatte. Stattdessen haben wir die Expression der muskarinergen Rezeptorsubtypen M1, M3 und M5

nachgewiesen, welche die gleiche Signalkaskade aktivieren (262). Agonismus des M5 ACh Rezeptors führte in Zellkulturen von transfizierten NIH3T3-Zellen zu einer pro-proliferativen Antwort (236). In der humanen Melanom-Zelllinie A2058 führte M5 Stimulation dagegen über einen alternativen Signalweg zu einem reduzierten klonogenen Potential (237), was die gegensätzlichen Effekte in Kontroll- und CIA-KMM erklären könnte. Dass Arthritisinduktion die Signalweiterleitung von Rezeptoren verändern kann, wurde schon anhand des β 2-Adrenozeptors in Adjuvant-induzierter Arthritis gezeigt (233). Für VIP wurden anti-proliferative Effekte in HSZ über den VIP-Rezeptor 1 beschrieben (263).

Der Einfluss von NA, ACh und VIP auf die Caspase 3/7-Aktivität war komplett entgegengesetzt in KMM aus immunisierten und NaCl-behandelten Tieren. In Kontroll-KMM führte die Neurotransmitterstimulation 15 Tage nach NaCl-Behandlung zu einer starken Induktion der Apoptose, während CIA-KMM 15 Tage nach Immunisierung durch unbekannte Mechanismen vor Neurotransmitter-induzierter Apoptose geschützt sind. In *in vitro*-Kulturen konnte die Stimulation mit 10^{-6} M und 10^{-8} M NA, Apoptose in Lymphozyten und einer Makrophagen-Zelllinie induzieren (264, 265). Ein möglicher veränderter Einfluss katecholaminerger Rezeptorstimulation kann durch verschiedene Expressionsmuster adrenerger Rezeptoren unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen vermittelt werden, wie sie für die α 2- und α 1D-adrenergen Rezeptoren beobachtet wurden (231, 232). Für VIP wurden gegenteilige Effekte auf die Induktion von Apoptose beschrieben, die unsere Ergebnisse stützen: zum einen konnte VIP Apoptose in Neutrophilen aus dem Blut gesunder Spender induzieren (266), während es andererseits murine azinöse Zellen vor TNF-induzierter Apoptose schützen konnte (267). Studien mit den muskarinergen ACh-Rezeptoren M3 und M5 zeigen stattdessen protektive Effekte durch Inhibition von Apoptose in *chinese hamster ovary cells* (167).

CIA moduliert den Einfluss der sympathischen Neurotransmitter ACh, NA und VIP auf Adhäsion und Proliferation von KMM in den verschiedenen Krankheits-Phasen. So konnte gezeigt werden, dass anti-proliferative Effekte von NA, ACh und VIP auf Kontroll-KMM in der chronischen CIA-Phase gehemmt wurden. Die Hemmung der Adhäsion von KMM an Kollagen I und Laminin nach katecholaminerger Stimulation wurde durch CIA ebenfalls aufgehoben und würde so die Migration von KMM eher verstärken.

5.3 Einfluß von CIA auf die Osteoklastogenese von Knochenmark-Makrophagen

Die progressive Zerstörung des periartikulären Knochens ist ein Charakteristikum von RA. Die Ursache des fortschreitenden Knochenabbaus ist die überschießende Aktivierung von Osteoklasten durch die verstärkte lokale Expression von pro-osteoklastogenen Faktoren im entzündeten Synovialgewebe. Ein Punkt dieser Dissertation war die Beantwortung der Frage, ob durch Kollagen-induzierte Arthritis auf der Ebene des Knochenmarks Veränderungen in der Osteoklastogenese von KMM induziert werden, die unabhängig von erhöhten pro-osteoklastogenen Konzentration von RankL oder auch TNF und IL-1 wirken.

Die M-CSF / RankL-induzierte Osteoklastogenese wurde durch CIA nicht beeinflusst, die Anzahl der Osteoklasten nach 5 Tagen Differenzierung war vergleichbar in KMM aus arthritischen und NaCl-behandelten Tieren, obwohl durch CIA die Genexpression von Differenzierungsmarkern wie den Rezeptoren für M-CSF und RankL, NFATc1 und Calcitonin-Rezeptor herunterreguliert wurde. In verschiedenen Studien wurde eine erhöhte Osteoklastogenesekapazität von peripheren Blutmonozyten von RA-Patienten nachgewiesen (268). Li und Kollegen konnten dagegen im Arthritismodell der TNF-transgenen Maus feststellen, dass diese erhöhte Osteoklastendifferenzierung in Arthritis auf Vorläuferzellen aus Blut und Milz begrenzt ist während Vorläuferzellen des Knochenmarks unverändert reagieren (269). Daraus haben sie geschlussfolgert, dass die Mobilisierung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in die Peripherie die Ursache für die erhöhte Osteoklastogenese in Arthritis ist, was durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie weiter unterstützt wird. Durch CIA wurden Änderungen in der Kernanzahl von Osteoklasten induziert, mit einer Reduktion der Anzahl kleiner Osteoklasten mit 3-5 Zellkernen und einer tendenziellen Erhöhung der Osteoklastenanzahl mit mehr als 10 Zellkernen. Studien, in denen die Fusion von Osteoklastenvorläuferzellen zu Osteoklasten beeinträchtigt war, zeigten eine geringere planare Größe der Osteoklasten und kleinere Resorptionsflächen einhergehend mit einer erhöhten *in vivo*-Knochenmasse (270). In Mäusen mit hypernukleären Osteoklasten wurde dagegen, ähnlich zum humanen Paget Syndrom, eine verstärkte Knochenresorption beobachtet (271). Die tendenzielle Induktion von Osteoklasten mit einer erhöhten Anzahl von Nuclei könnte ein Indikator für eine höhere Resorptionsaktivität von Osteoklasten, die aus den KMM von arthritischen Tieren differenziert wurden, bedeuten. Um die Aktivität von Osteoklasten aus arthritischen mit NaCl-behandelten Tieren zu vergleichen, wurde zum einen die Kathepsin K-Aktivität im Zellkulturüberstand der Osteoklastenkulturen bestimmt und zum anderen die Resorption einer knochenähnlichen Matrix analysiert. Kathepsin K degradiert in

der Resorptionslakune den proteinogenen Anteil der Knochenmatrix v. a. Kollagen I. Die Analyse der enzymatischen Aktivität von Kathepsin K im Zellkulturüberstand von Osteoklasten, die aus den KMM arthritischer Tiere differenziert wurden, zeigte im Vergleich zu den Kontrollkulturen überraschenderweise eine geringere Kathepsin K-Aktivität, die sich vor allem in der chronischen CIA-Phase manifestierte. Die Analyse der mRNA-Expression von Kathepsin K in verschiedenen CIA-Stadien, zeigte ebenfalls eine signifikante Herunterregulation im Vergleich zu Osteoklasten aus Kontrolltieren, vor allem in den frühen CIA-Phasen (10, 15 Tage). Ob die enzymatische Aktivität gehemmt ist oder ob die Enzymmenge reduziert wird, konnte zwar mit dem angewandten Assay nicht unterschieden werden, aber unabhängig von der Ebene der Regulation bedeutet diese Beobachtung eine geringere proteolytische Aktivität von Kathepsin K. Im Gegensatz dazu wurde eine erhöhte Konzentration von Kathepsin K im Serum von Patienten mit aktiver RA nachgewiesen (272) und die Inhibition von Kathepsin K konnte in Kollagen-induzierter Arthritis das Auftreten von Knochenerosionen verhindern (90). Die unveränderte Kathepsin K-Aktivität in der akuten CIA-Phase, die im Gegensatz zu den hohen Serumlevel in aktiver humaner RA steht, kann an der Diskrepanz zwischen peripheren *in vivo*-Effekten und isolierten Knochenmark-Effekten liegen, die auch schon für die Differenzierung von Osteoklasten beobachtet wurde. Dass mit Chronifizierung der CIA die Kathepsin K-Aktivität in den Kulturüberständen abnimmt, könnte für einen CIA-induzierten, regulatorischen Mechanismus sprechen, der auf der Ebene des Knochenmarks wirksam wird. Dadurch können bisher unbekannte Abläufe wirksam werden, die zu einer gehemmten Kathepsin K-Aktivität bzw. Enzymmenge führen und so eine weitere Degradation des Knochens verhindern. Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass in osteoklastogen differenzierten KMM-Kulturen aus chronisch-arthritischen Tieren eine signifikant erhöhte Resorption von knochenähnlicher Matrix gemessen wurde, während bis zum akuten Zeitpunkt von CIA kein Unterschied zu Osteoklastenkulturen aus NaCl-behandelten Tieren bestand. Die Expression von Genen, die mit der Aktivität von Osteoklasten assoziiert werden wie Kathepsin K, MMP-9, TRAP, Kohlensäureanhydrase II und einer Untereinheit der ATPase (*tcirg1*), ist hauptsächlich in den frühen Phasen (10, 15 Tage) gehemmt, ausgenommen nur TRAP (20 Tage) und *tcirg* (40 Tage). Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse und der tatsächlichen Resorptionsaktivität lässt sich eventuell durch Unterschiede in der Probennahme für die verschiedenen Assays erklären. Proben für die PCR-Analyse wurden nach fünf Tagen Differenzierung isoliert, während die Kulturdauer für die Resorptionsassays vier Wochen

betrug. Eine ähnliche Erklärung könnte auch für die Unterschiede in der reduzierten Kathepsin K-Aktivität nach insgesamt sechs Tagen Kultivierung im Vergleich zu der erhöhten Resorption nach vier Wochen Kultivierung verantwortlich sein. Allgemein kann für Langzeit-Osteoklastenkulturen gesagt werden, dass die Interpretation der Daten sehr schwierig ist, da, wie Akchurin et al. gezeigt haben, das Verhalten von Makrophagen und Osteoklasten in diesen Kulturen hochgradig variabel ist und eine komplexe Dynamik verschiedener Zyklen von Osteoklastogenese auftreten kann (273). Zusätzlich konnten wir in unseren Osteoklastenkulturen mit verlängerter Kulturdauer die Proliferation von Zellen beobachten, die Verunreinigungen durch Osteoblasten / Stromazellen oder mesenchymale Stammzellen darstellen können, die während der KMM-Isolation nicht komplett entfernt wurden, aber deren Anzahl so gering war, dass sie in der durchflusszytometrischen Charakterisierung nicht auffielen. Die Isolation von KMM über Plastikadhäsion ist eine anerkannte Isolationsmethode, aber garantiert keine reine Population. Für den Großteil der Osteoklastenexperimente, die einen relativ kurzen Zeitraum von maximal sechs Tagen umfassen, stellt die Verunreinigung kein Problem dar. Bei Langzeitversuchen, wie dem Resorptionsassay, kann dagegen ein Einfluss der Zellverunreinigung nicht ausgeschlossen werden, da diese Zellen im Vergleich zu Osteoklasten und KMM stärker proliferieren und ihr Anteil an der Kultur dadurch prozentual zunehmen kann. Durch Interaktion mit Osteoklasten und KMM-Vorläuferzellen kann somit die Resorption der Matrix beeinflusst werden. Die erhöhte Resorption in der chronischen CIA-Phase, die im Gegensatz zur reduzierten Kathepsin K-Aktivität steht, kann also entweder durch Enthemmung der Osteoklastenaktivität durch Langzeitkultivierung verursacht werden oder durch Prozesse, die von den Zellverunreinigungen aus den arthritischen Ratten induziert werden.

Unabhängig von der Differenzierung oder Aktivierung von Osteoklasten, könnte eine Inhibition der Apoptose den Lebenszyklus von Osteoklasten verlängern und so ebenfalls die Entstehung von Knochenerosionen begünstigen. In RA werden im Gelenk anti-apoptotische Moleküle wie Bcl-2 und FLIP exprimiert, die das Überleben von Makrophagen, den Osteoklastenvorläuferzellen, begünstigen (254, 255). Hohe Expressionsraten von M-CSF und RankL dagegen, die ebenfalls im Bereich entzündeter arthritischer Gelenke beschrieben wurden (147, 149), fördern das Überleben von Osteoklasten. Wir haben daher den Einfluss von CIA auf die Caspase 3/7-Aktivität in Osteoklasten nach Deprivation von M-CSF und RankL untersucht. Osteoklasten, die aus dem Knochenmark von arthritischen Ratten differenziert wurden, wiesen eine signifikant erhöhte Apoptose-Sensitivität nach Deprivation

von M-CSF und RankL auf, die von Tag 10 nach Immunisierung bis in die akute Phase von CIA persistierte, aber in der chronischen Phase nicht mehr messbar war. Parallel dazu war die Genexpression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-2 deutlich erniedrigt (10-40 Tage nach Immunisierung) und die Expression von pro-apoptotisch wirkendem c-myc signifikant erhöht (20 und 40 Tage nach Immunisierung). Normal kann die Expression von Bcl-2 die Induktion von Apoptose über c-myc inhibieren (274), aber durch die reduzierte Genexpression von Bcl-2 geht diese protektive Wirkung verloren und ein allgemein pro-apoptotischer Phänotyp wird wirksam. Diese Beobachtung könnte eine initiale regulatorische Gegenmaßnahme des Organismus darstellen, um eine übermäßige Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung zu verhindern. Beispielsweise werden schon sehr früh in der Arthritis Signale, wie die ACPA gegen citrulliniertes Vimentin, auf der Zelloberfläche von Osteoklastenvorläuferzellen exprimiert, die die Osteoklastogenese begünstigen (146). In der chronischen Phase reduziert sich, mit dem Absinken der Konzentrationen pro-inflammatorischer Mediatoren, der pro-osteoklastogene Stimulus und der induzierte Mechanismus kann wieder abgeschaltet werden, da andere Effekte, wie anti-resorptive Kathepsin K-Hemmung, einem weiteren Knochenabbau entgegenwirken können.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Dissertation deutlich gezeigt werden, dass die Differenzierung von KMM zu Osteoklasten durch CIA wenig beeinflusst wurde, die Aktivität dagegen vor allem in der chronischen Phase moduliert wurde. Die Ergebnisse zur Resorptionsaktivität sind nicht eindeutig alleinigen CIA-Effekten auf die Osteoklastenaktivität zuzuordnen. Wir konnten sehr deutlich zeigen, dass durch CIA die Apoptose-Sensitivität durch M-CSF/RankL-Deprivation von der frühen bis zur akuten Phase der Arthritis erhöht wurde und so einer überschießenden Osteoklastenaktivierung entgegensteuern kann.

5.3.1 Genexpressionsanalyse Osteoklasten-assoziiierter Markergene

Im Rahmen dieser Dissertation wurde auch die Expression einer Vielzahl von Genen quantifiziert, die mit der Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten sowie dem M-CSF-Rezeptorsignalweg assoziiert sind. Die Genexpressionsanalyse von Rezeptoren für ACh, NA und VIP wird im nächsten Abschnitt diskutiert. Die Genexpressionsanalysen korrelierten nicht mit den beobachteten zellulären Effekten. So war zwar die Genexpression von Differenzierungsmarkern reduziert, aber die Anzahl der Osteoklasten wurde durch CIA nicht beeinflusst, wohingegen in der chronischen CIA-Phase eine Reduktion der Kathepsin K-

Aktivität zu beobachten war, die auf Genexpressionsebene nicht sichtbar wurde. Da Genexpressionsänderungen sich nicht immer auf Proteinebene auswirken und *vice versa*, kann diese Diskrepanz durchaus plausibel sein. Allerdings konnte bei der Auswertung der Genexpressionsdaten ein deutlicher Einfluss der CIA-Zeitpunkte herausgearbeitet werden. Für alle Gene, ausgenommen *c-myc*, konnte ein inhibierender Einfluss von CIA auf die Expression festgestellt werden, der sich vor allem in der asymptomatischen Phase und mit dem Auftreten der ersten Symptome manifestierte. Verschiedene Arbeitsgruppen haben mittels Microarrays die Genexpression in peripheren Blutmonozyten, Knochenmarkszellen oder Biopsien des Synovialgewebes von RA-Patienten oder aus mRNA, isoliert aus den entzündeten Pfoten und peripheren Blutmonozyten von Tieren mit CIA, auf Unterschiede zu gesundem Gewebe untersucht. Bisher wurden Unterschiede in der Genexpression verschiedener metabolischer Signalwege in Zellen aus RA- und OA- Gewebe oder gesundem Gewebe gefunden, aber es sind nur wenige Daten bezüglich Osteoklasten-spezifischer Gene verfügbar. Olsen et al. konnten zeigen, dass man anhand der Genexpressionsprofile von peripheren Blutmonozyten, Arthritispatienten in einem frühen Krankheitsstadium von denen in späteren Stadien unterscheiden kann (275). In frühen Stadien waren dabei Gencluster reguliert, die mit immunregulatorischen Stoffwechselwegen, Neoplasie, Transkription, Translation und Zellzyklus assoziiert waren. In einem murinen Arthritismodell wurde dagegen gezeigt, dass im Gewebe von entzündeten Pfoten die Genexpression von Genen, die in Transkription und Zellzyklus involviert sind, hochreguliert war im Vergleich zu gesundem Gewebe (276). Interessanterweise wurde die Expression von *csf1* (M-CSF), dem *csf1*-Rezeptor (M-CSF-Rezeptor) sowie von *Akt1*, einer Proteinkinase aus dem Rezeptorsignalweg von M-CSF, in mRNA aus Pfoten von CIA-Tieren in der frühen, akuten und chronischen Phase nachgewiesen (277). Es konnte nur in der frühen CIA-Phase eine minimale Hochregulation von M-CSF nachgewiesen werden und keine Änderungen in den späten Phasen, so dass M-CSF und der Signalweg des M-CSF-Rezeptors vielleicht eher zu den weniger regulierten Genclustern in späten CIA-Phasen gehört, was wir durch unsere Studie bestätigen konnten. Neben Spezies-Unterschieden spielen vor allem auch die untersuchten Kompartimente eine wichtige Rolle. Shou und Kollegen konnten durch den Vergleich von Microarray-Daten aus peripheren Blutmonozyten mit Daten aus dem Gewebe entzündeter Pfoten zeigen, dass es nur marginale Übereinstimmungen der regulierten Gencluster zwischen den beiden Kompartimenten gab, obwohl die involvierten biologischen Prozesse ähnlicher Natur waren (278). Einen klaren Hinweis auf eine Hemmung der allgemeinen

Genexpressionsrate, wie wir ihn in unseren Analysen nachgewiesen haben, war in der Literatur nicht zu finden. Das liegt vielleicht an der Tatsache, das Knochenmark-Zellen weniger durch CIA beeinflusst werden als beispielsweise Zellen des Synovialgewebes, wo die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine und Osteoklastenmarkergene wie Kathepsin K, TRAP und Rank-Rezeptor vergleichsweise stark erhöht war (279). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Genexpression von Osteoklastenmarkern und Molekülen des M-CSF-Rezeptorsignalweges vor allem in der asymptomatischen Phase und mit beginnender Arthritis durch CIA gehemmt wurde, sich aber, abgesehen von dem Einfluss auf die apoptotische Aktivität von Osteoklasten, nur in geringem Umfang auf zellulärer Ebene ausgewirkt hat.

5.4 Einfluss sympathischer Neurotransmitterstimulation auf die Osteoklastogenese von Knochenmark-Makrophagen

Um die Reaktivität der differenzierten Osteoklasten auf die Stimulation mit ACh, NA und VIP zu gewährleisten, wurde die Genexpression einer Vielzahl von deren Rezeptoren in Osteoklasten, die aus den KMM arthritischer Tiere differenziert wurden, relativ zur Genexpression dieser Rezeptoren in Osteoklasten aus den KMM von Kontrolltieren analysiert. Wir konnten die mRNA verschiedener Rezeptoren für ACh, NA und VIP nachweisen und durch CIA wurde besonders die Expression des muskarinergen ACh-Rezeptors M3, VIP-Rezeptor 1 und PACAP-Rezeptor 1 sowie des β 2-Adrenozeptors, im Vergleich zur mRNA-Expression von Osteoklasten/KMM aus Kontrolltieren, gehemmt. Im Zeitverlauf wurde deutlich, dass die Expression der Rezeptoren im Gegensatz zu den Osteoklastenmarkergenen nicht allein in den frühen Phasen betroffen war, sondern alle Phasen der CIA betraf. Im Zeitverlauf der Arthritis konnten zusätzlich CIA-Einflüsse auf die Expression von ACh-Rezeptor M5, Adrenozeptor α 1D und α 2B sowie VIP-Rezeptor 2 festgestellt werden. Die Expression des M5 ACh-Rezeptors in CIA-Osteoklasten zeigte im Zeitverlauf die intensivste Regulation mit einer starken Hemmung 10 Tage nach Immunisierung (-3,5) und der stärksten Induktion 20 Tage nach Immunisierung (+2,75), was die Vermutung nahelegt, das der Rezeptor in der Regulation der Osteoklastogenese eine wichtige Rolle spielen könnte. Der Einfluss muskarinerges ACh-Rezeptoren auf die Osteoklastogenese wurde bisher noch nicht beschrieben, nur die Expression in Osteoblasten-ähnlichen Zellen und anderen Knochenzellen konnte bisher nachgewiesen werden (280). Interessanterweise war 20 Tage nach Immunisierung die Genexpression von 5 von 9

Rezeptoren hochreguliert, obwohl zu allen anderen Zeitpunkten CIA einen eher hemmenden Einfluss auf die Genexpression hatte. Die hochgradige Entzündungsreaktion, die zu diesem Zeitpunkt in den Tieren im Gang war, kann dementsprechend andere, teilweise schon früh induzierte Prozesse, überlagern und so mögliche gegenregulatorische Mechanismen aushebeln. Die Beobachtung kann aber auch bedeuten, dass der Regulation durch Neurotransmitter in der inflammatorischen Phase der Arthritis eine besondere Bedeutung zukommt. Im Gegensatz zur Genexpression wurde die per Immunfluoreszenzfärbung qualitativ analysierte Proteinexpression und -lokalisierung von PACAP-Rezeptor 1, ACh-Rezeptor M5 und der Adrenozeptoren $\alpha 1D$, $\alpha 2B$ und $\beta 2$ zu keinem Zeitpunkt nach Immunisierung beeinflusst. Ein Einfluss von CIA auf Downstream-Effekte der Rezeptor-assoziierten Signalwege mit einhergehenden Änderungen in der Effektorfunktion der Osteoklasten nach Rezeptoraktivierung durch den entsprechenden Liganden, ist jedoch möglich, wie auch für den $\beta 2$ -Adrenozeptor im Tiermodell der Adjuvant-induzierten Arthritis gezeigt werden konnte (233).

Stimulation mit ACh, NA und VIP während der Osteoklastogenese hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die Anzahl der differenzierten Osteoklasten. Durch ACh wurde die Anzahl der Osteoklasten, die aus CIA- und Kontroll-KMM differenziert wurden, erhöht. Im Zeitverlauf der Arthritis wurde deutlich, dass die Osteoklastogenese von CIA-KMM vor allem 15 Tage nach Immunisierung betroffen war, während Kontroll-KMM 40 Tage nach NaCl-Behandlung verstärkt auf die Stimulation mit ACh reagierten. Tanaka et al. zeigten, dass Stimulation mit Nikotin gegensätzliche Effekte auf die Osteoklastogenese hatte (208). In dieser Studie wurde durch Inkubation mit Nikotin die Anzahl der Osteoklasten leicht erhöht sowie eine größere Anzahl von Resorptionslakunen gefunden, wohingegen der Kalziumausstrom und auch die Größe der Resorptionsfläche auf Dentin verringert waren. Da die Effekte durch Inhibition der nikotinergen Rezeptoren mit α -Bungarotoxin geblockt werden konnten, wurde postuliert, dass der $\alpha 7$ nAChR der Vermittler der beobachteten Veränderungen sein müsse. Der $\alpha 7$ nAChR konnte im Verlauf dieser Doktorarbeit weder auf Osteoklasten noch auf Knochenmark-Makrophagen, wie unter 5.2. erwähnt, detektiert werden. Stattdessen wurde die Expression der muskarinergen ACh-Rezeptoren M3 und M5 auf Osteoklasten gefunden, die, wie oben erwähnt, im Zusammenhang mit Osteoklasten bisher noch nicht beschrieben wurden. Bisher wurde nur die Expression von mRNA des M3 ACh-Rezeptors in den mononukleären Blutzellen von Ratten detektiert (281) sowie die Expression muskarinerg ACh-Rezeptoren auf Osteoblasten-ähnlichen Zellen und

Knochengewebe (280). Der Einfluss von ACh auf die Osteoklastogenese, der in dieser Arbeit beschrieben wurde, könnte daher durch muskarinerge Rezeptoren vermittelt werden oder durch andere nikotinerge Rezeptortypen, die hier nicht untersucht wurden. Für ACh wurden mitogene Effekte auf Ratten-Astrozyten und humane Astrozytomzellen beschrieben, die über muskarinerge Rezeptoren vermittelt werden (282). Möglicherweise wirkt ACh also nicht direkt osteoklastogen, sondern fördert die Proliferation von Vorläuferzellen, die dann zu einer erhöhten Anzahl von Osteoklasten differenzieren können. NA-Effekte auf die Osteoklastenanzahl waren dosisabhängig, so führte Stimulation mit 10^{-6} M NA via β -Adrenozeptorsignalvermittlung zu einer Reduktion der Osteoklastenanzahl, während 10^{-8} M NA über α -Adrenozeptoren die Osteoklastogenese verstärkte. Die jeweiligen Effekte variierten abhängig vom beobachteten Zeitpunkt nach Immunisierung bzw. NaCl-Applikation: der Einfluss von 10^{-6} M und 10^{-8} M NA auf CIA-Osteoklasten konnte vorwiegend in den frühen Arthritis-Phasen beobachtet werden, während Osteoklasten aus Kontrollen sowohl früh nach NaCl-Applikation als auch in späten Phasen betroffen waren. In der Literatur werden β 2-adrenerg vermittelte Reaktionen immer mit einer verstärkten Osteoklastogenese assoziiert. Beispielsweise induziert die Stimulation des β 2-Adrenozeptors eine verstärkte Osteoklastenbildung in RAW264.7-Zellen und murinen Knochenmarkzellen durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (283). Die Induktion der Osteoklastogenese wird dagegen in unserem System eher α -adrenerg vermittelt. Arai et al. konnten die Expression der α -Adrenozeptoren 1B und 2B auf Osteoklasten-ähnlichen multinukleären Zellen nachweisen, aber Stimulation mit dem α 1-Agonisten Phenylephrin hatte keinerlei Einfluss auf die Osteoklastogenese, so dass die Rolle der α -adrenergen Rezeptoren in der Osteoklastogenese recht ungenau definiert ist (205). Im Unterschied zum experimentellen Aufbau dieser Doktorarbeit, haben Arai et al. den adrenergen Stimulus in ausdifferenzierten Osteoklasten gesetzt, während in der vorliegenden Arbeit gleichzeitig mit Induktion der osteoklastogenen Differenzierung auch der adrenerge Stimulus zugegeben wurde, was ein Grund für die unterschiedlichen Beobachtungen sein könnte. Der Einfluss der Neurotransmitter auf die Kernanzahl von Osteoklasten war vergleichbar mit den Effekten auf die Gesamtzahl von Osteoklasten. Einzig für VIP konnte eine interessante Beobachtung gemacht werden. In den KMM aus NaCl-behandelten Tieren induzierte Stimulation mit VIP während der Differenzierung eine höhere Anzahl sehr großer Osteoklasten. Der Effekt wurde durch CIA komplett gehemmt. Einerseits wäre dies der erste Beweis für einen differentiellen

Einfluss von VIP unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen und andererseits beweist es die anti-inflammatorische und in diesem Fall eher anti-resorptive Eigenschaft von VIP in Arthritis. Diese Beobachtung wird dadurch unterstrichen das VIP, als Nanomedizin in Mizellen verpackt, die Auswirkungen experimenteller Arthritis abmildern konnte (284).

Stimulation mit ACh, NA und VIP hatte unterschiedliche Effekte auf die Kathepsin K-Aktivität. Die enzymatische Aktivität wurde durch 10^{-6}M ACh, sowohl in Osteoklastenkulturen von arthritischen als auch von NaCl-behandelten Ratten induziert, was durch die Erhöhung der Osteoklastenanzahl nach ACh-Stimulation erklärt werden kann. VIP reduzierte die Kathepsin K-Aktivität in Zellkulturüberständen von CIA- und Kontroll-Osteoklasten. Literaturdaten zeigten, dass die Wirkung von VIP auf Osteoklasten weniger die Differenzierung beeinflusst, sondern vor allem die Osteoklastenaktivität betrifft (285). Wir konnten dagegen zeigen, dass VIP auch die Differenzierung beeinflusst, da sich vermehrt Osteoklasten mit mehr als zehn Zellkernen gebildet haben. Dieser Effekt kann in anderen Studien unbemerkt geblieben sein, da die Gesamtanzahl an Osteoklasten unverändert blieb. Aus den Ergebnissen unserer Studien können wir außerdem schließen, dass Osteoklasten, die aus den KMM von CIA-Ratten differenziert wurden, sensibler auf geringere Konzentrationen von VIP reagieren. Im Arthritiszeitverlauf wurde durch VIP die Kathepsin K-Aktivität im Zellkulturüberstand von CIA-Osteoklasten mit Beginn der symptomatischen Phase und in der akuten Phase reduziert, während im Kulturüberstand von Kontroll-Osteoklasten ab Tag 15 nach NaCl-Behandlung eine kontinuierliche Reduktion der Kathepsin K-Aktivität durch VIP deutlich wurde. Auch NA-Stimulation führte zu einer Inhibition der Kathepsin K-Aktivität im Zellkulturüberstand, wobei die höhere Konzentration von 10^{-6}M NA Osteoklasten von CIA und Kontroll-Ratten beeinflusste, während 10^{-8}M NA nur die Kathepsin K-Aktivität von CIA-Osteoklasten beeinflussen konnte. Wenn man den Einfluss von NA im Zeitverlauf der Arthritis betrachtet, konnten signifikante Einflüsse auf die Kathepsin K-Aktivität nur im Zellkulturüberstand von CIA-Osteoklasten gefunden werden. Durch 10^{-6}M NA wurde die Kathepsin K-Aktivität von der asymptomatischen Phase bis zur akuten Phase inhibiert. Der inhibierende Einfluss von 10^{-8}M NA war dagegen ausschließlich in der akuten CIA-Phase wirksam. Die in der Literatur beschriebene, aktivierende Wirkung von NA über den $\beta 2$ -Adrenozeptor auf die Osteoklastogenese konnten wir in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen. Im Tiermodell der Adjuvant-induzierten Arthritis wurde gezeigt, dass die Induktion von Arthritis Veränderungen im $\beta 2$ -Signalweg bewirken kann, wie z.B. ein

verändertes Phosphorylierungsmuster und Änderungen in der cAMP-Produktion, die abhängig vom Arthritiszeitpunkt sowie dem untersuchten Immunkompartiment waren (233) und so die unterschiedlichen Beobachtungen unserer Studie erklären können.

Aufgrund der cAMP-assoziierten Signalwege von NA- und VIP-Rezeptoren vermuteten wir, dass cAMP als Vermittler der inhibitorischen Effekte von NA und VIP auf die Kathepsin K-Aktivität und dosisabhängig auch für inhibitorische NA-Effekte auf die Osteoklastendifferenzierung fungiert. Es wurde gezeigt, dass die inhibitorischen Effekte von Calcitonin und Forskolin auf die Osteoklastogenese über anhaltende Aktivierung der Adenylatzyklase vermittelt werden (286, 287). VIP- und NA-Effekte werden über G_s Protein-gekoppelte Rezeptorkaskaden geleitet, die zur Aktivierung von Adenylatzyklase und zur verstärkten Synthese von intrazellulärem cAMP führen (164, 288). Um die Hypothese zu überprüfen, dass erhöhte cAMP-Konzentrationen die inhibitorischen Effekte von NA und VIP vermitteln, wurde der Einfluss des Adenylatzyklaseaktivators NKH477 auf die Osteoklastenanzahl und die Kathepsin K-Aktivität untersucht. NKH 477 konnte tatsächlich Anzahl und Kathepsin K-Aktivität in Osteoklasten, die aus den KMM von arthritischen und NaCl-behandelten Tieren differenziert wurden, signifikant hemmen. Die Regulation der Kathepsin K-Aktivität durch NA und VIP wird demzufolge über cAMP-assoziierte Signalwege vermittelt, während in der Regulation der Osteoklastogenese weitere Signalwege involviert sein müssen, da nur 10^{-6} M NA hemmend auf die Osteoklastenanzahl wirkte. Die Induktion der Osteoklastogenese durch ACh unterstützt diese Beobachtungen, da die Effekte wahrscheinlich über muskarinerge M3 und M5 Rezeptoren vermittelt werden. Diese sind G_q Protein-gekoppelt und führen zur Aktivierung von Phospholipase C und darüber zur Aktivierung anderer intrazellulärer Zielmoleküle und Effektorfunktionen (167).

Für die Matrixresorption konnten zusätzlich zu den beobachteten CIA-Effekten in der späten Phase keine weiteren Effekte durch Stimulation mit ACh, NA und VIP beobachtet werden, ähnlich wie für die Caspase 3/7-Aktivität, wo nur 10^{-8} M NA in Kontroll-Osteoklasten die Induktion der Caspase 3/7 verstärken konnte. Die Resorption der extrazellulären Matrix könnte durch Effekte, die unter 5.3. beschrieben wurden, beeinflusst worden sein und war daher nicht auswertbar.

Interessanterweise konnten, was bei KMM nicht der Fall war, Effekte von ARR17779 auf Osteoklasten beobachtet werden, die nicht mit Lösungsmittelleffekten durch DMSO erklärt werden konnten, obwohl der korrespondierende $\alpha 7$ nACh-Rezeptor nicht nachweisbar war. Während der Osteoklastogenese von KMM aus Kontrollen führte ARR17779

konzentrationsabhängig zur vermehrten Induktion von Osteoklasten mit 3-5, 6-10 und mehr als 10 Zellkernen, während CIA-KMM nur wenig beeinflusst wurden. Aufgrund der hohen Streuung der Daten konnten diese Effekte bei der Bestimmung der Gesamtanzahl der Osteoklasten nicht herausgearbeitet werden. Weiterhin wurde durch 10^{-6} und 10^{-8} M ARR17779 die Kathepsin K-Aktivität in den Überständen der CIA-Osteoklastenkulturen deutlich gehemmt, während in den Zellkulturüberständen der Osteoklasten aus Kontrolltieren eine Reduktion nur nach Stimulation mit 10^{-8} M ARR17779 zu beobachten war. Bisher sind keine Studien über den Einfluss von ARR17779 auf Osteoklasten oder deren Kathepsin K-Aktivität bekannt. Für den nikotinergen Rezeptoragonisten Nikotin gibt es allerdings widersprüchliche Aussagen: Tanaka et al. konnten zeigen, dass Nikotin, im Gegensatz zu unseren Beobachtungen, die Bildung großer Osteoklasten mit vielen Zellkernen eher inhibierte. Die Autoren konnten allerdings ebenfalls beobachten, dass die mRNA- und Proteinexpression von Kathepsin K durch Nikotin reduziert wurde (208), was die Befunde unserer Arbeit stützen würde. Die Möglichkeit besteht, dass die Expression des $\alpha 7$ AChR durch ARR17779-Stimulation in den Osteoklasten erst induziert wurde und dementsprechend durch den Agonisten-vermittelte Effekte beobachtet werden konnten. So wurde in der Studie von Tanaka et al. auch gezeigt, dass durch Nikotin die Expression des $\alpha 7$ nAChR weiter verstärkt wurde. ARR17779 führte zur Reduktion der Kathepsin K-Aktivität und das Ansprechen des $\alpha 7$ AChR könnte daher als anti-resorptiver Faktor in Osteoklasten wirksam sein.

CIA moduliert die Reaktivität von Osteoklasten auf sympathische Neurotransmitterstimulation mit ACh, NA und VIP und könnte so die Adaptation an lokal veränderte Konzentrationen der Neurotransmitter ermöglichen. NA und VIP haben klare anti-resorptive, protektive Effekte durch Inhibition der Kathepsin K-Aktivität, die höchstwahrscheinlich über Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts vermittelt werden. Im Gegensatz dazu bewirkte ACh eine Erhöhung der Kathepsin K-Aktivität, die über muskarinerge Rezeptoren induziert werden könnte. Die Beteiligung muskarinerger Rezeptoren an der Regulation der Osteoklastenaktivität ist bisher noch nicht gezeigt worden. Der anti-inflammatorische Rezeptor $\alpha 7$ nAChR wird möglicherweise durch spezifischen Agonismus auf Osteoklasten induziert und führt zur Inhibition der Kathepsin K-Aktivität.

Zusammenfassung

Makrophagen sind Vorläuferzellen von Osteoklasten, deren übermäßige Aktivierung in Rheumatoider Arthritis (RA) zur Erosion des gelenknahen Knochens beiträgt. Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems wie Noradrenalin (NA), Acetylcholin (ACh) und vasoaktives intestinales Peptid (VIP) wirken als Modulatoren der Arthritis. Arthritis induziert Veränderungen in der lokalen synovialen Innervierung, die ein lokal verändertes Neurotransmitter-Mikromilieu erzeugen. Knochen- und Periostzellen können Faktoren exprimieren, die in der Lage sind, eine Veränderung des katecholaminergen Phänotyps von Nervenfasern in einen cholinerg / peptidergen (VIP) Phänotyp zu induzieren und somit eine neue regulatorische Neurotransmitterumgebung zu schaffen. In einem DA-Rattenmodell der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis (CIA) sollte daher der Einfluss der Neurotransmitter ACh, NA und VIP auf zelluläre und metabolische Eigenschaften von Knochenmark-Makrophagen (KMM) und deren Osteoklastogenesekapazität in verschiedenen Arthritisstadien untersucht werden.

Sowohl KMM als auch Osteoklasten exprimieren Rezeptoren für ACh, NA und VIP und können somit auf Neurotransmitterreize reagieren. Die Genexpressionsrate verschiedener Rezeptorgene wird durch CIA in Osteoklastenkulturen größtenteils gehemmt, aber auf Proteinebene wurden nach qualitativer Auswertung keine Unterschiede in der Rezeptorexpression und -lokalisation der Adrenozeptoren $\alpha 1D$, $\alpha 2B$ und $\beta 2$, dem muskarinergen ACh Rezeptor M5 sowie dem alternativen VIP-Rezeptor PACAP-Rezeptor 1 festgestellt. Bemerkenswert ist, dass die Expression muskarinerges ACh Rezeptoren zuvor noch nicht auf Osteoklasten nachgewiesen wurde. Einflüsse von CIA auf die intrazelluläre Signalkaskade können aber nicht ausgeschlossen werden und sind in dieser Arbeit nicht analysiert worden.

Auffällig war, dass nach Isolierung über Plastikadhärenz, die Anzahl der KMM aus akut arthritischen Ratten signifikant kleiner war im Vergleich zu Kontrollratten. Parallel war dagegen der Anteil der myeloiden Zellpopulation im nativen Knochenmark durch akute CIA stark erhöht, was den erhöhten Bedarf an Immunzellen in Entzündungsreaktionen widerspiegelt. Als Ursache der reduzierten KMM-Anzahl nach Isolierung konnte eine starke Hemmung der Plastikadhäsion von KMM aus arthritischen Ratten beobachtet werden. Parallel dazu war die Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen Typ I und Fibronectin in der chronischen Phase der Arthritis gehemmt, die *in vivo* zu einer Inhibition der Migration von KMM im Gelenk führen kann und somit das Aufflammen einer erneuten

Entzündung verhindern könnte. Die Adhäsion an Kollagen Typ I und Laminin wurde in KMM aus Kontrolltieren durch NA gehemmt, während CIA-KMM keine Reaktion zeigten. Die Plastikadhäsion wurde dagegen durch NA in Kontroll-KMM verstärkt, während CIA-KMM keine Reaktion nach NA-Stimulation zeigten, dafür aber eine verstärkte Plastikadhärenz nach VIP-Stimulation. Dadurch konnte deutlich gezeigt werden, dass CIA die NA-gesteuerte Adhäsion moduliert und dass zumindest bezüglich der Adhärenz an Plastik, VIP die Anergie der CIA-KMM gegenüber NA-Stimulation kompensieren kann.

Des Weiteren wurden schon früh nach der Immunisierung Mechanismen induziert, die zu einer Hemmung der Proliferationskapazität von KMM hauptsächlich in CIA-Phasen mit geringer oder keiner Entzündung führen. Im akuten CIA-Stadium wird der hemmende Einfluss durch unbekannte Mechanismen aufgehoben und führt, unter Berücksichtigung der reduzierten Adhäsion, eher zu einer verstärkten Proliferation von KMM. Anti-proliferative Effekte von NA, ACh und VIP auf Kontroll-KMM wurden durch CIA moduliert und teilweise gehemmt. Bezüglich der Caspase 3/7 Aktivität induziert CIA mit dem Auftreten erster Symptome einen Switch in der Reaktivität nach Stimulation mit ACh, NA und VIP, der protektiv auf KMM wirkt. Damit haben wir deutliche Hinweise auf eine CIA-induzierte Regulation der Neurotransmitter-Reaktivität von KMM erhalten, die abhängig von der jeweiligen CIA-Phase ist und zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Apoptose und Proliferation betrifft.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der in dieser Arbeit untersucht wurde, ist die Osteoklastogenese von KMM in verschiedenen Stadien experimenteller Arthritis und der gleichzeitige Einfluss der Neurotransmitter ACh, NA und VIP. CIA verändert die Osteoklastogenese von KMM nicht auf der Differenzierungs-, aber auf der Aktivitätsebene, wie durch eine Hemmung der Kathepsin K-Aktivität im Kulturüberstand von Osteoklasten gezeigt wurde. Eine Hemmung der Produktion oder Aktivität von Kathepsin K wäre als eine Gegenmaßnahme des Organismus zu verstehen, die einen weiteren Abbau der Knochenmatrix verhindern oder verlangsamen könnte. Eine verstärkte Caspase 3/7-Aktivität nach M-CSF/Rankl-Deprivation in Osteoklastenkulturen aus CIA-Ratten, könnte ebenfalls eine regulatorische Maßnahme des Organismus darstellen, um der großen Anzahl von Osteoklasten in den gelenknahen Regionen entgegenzuwirken. Die Genexpressionsrate verschiedener Differenzierungs- und Aktivierungsmarker wurde durch CIA phasenabhängig gehemmt, scheint sich aber nicht auf Proteinebene zu manifestieren.

Zusätzlich dazu konnten wir einen starken inhibierenden Effekt von NA und VIP auf die Osteoklastenaktivität beobachten, der vor allem auf einer Hemmung der Kathepsin K-Aktivität beruhte und *in vivo* protektiv für die Knochenmatrix wäre. Vermittelt wird dieser Effekt zumindest teilweise über den cAMP-Signalweg, wie wir durch entsprechende Experimente mit einem Adenylatzyklase-Agonisten nachweisen konnten. Konträr dazu wurde durch ACh die Kathepsin K-Aktivität und die Matrixresorption verstärkt, sowie die Anzahl der gebildeten Osteoklasten erhöht. Die im Gegensatz dazu beobachtete dosisabhängige Hemmung der Osteoklastogenese und verstärkte Caspase 3/7-Aktivität nach Stimulation mit NA/VIP unterstützt den Befund, dass das cholinerge und adrenerge Nervensystem Gegenspieler in der *in vitro*-Osteoklastogenese und womöglich auch in der CIA-Pathogenese darstellen.

Die Modulation der Sensitivität gegenüber der Stimulation mit ACh, NA und VIP durch CIA ermöglicht Osteoklasten eine Adaptation an Veränderungen in der lokalen Neurotransmitterzusammensetzung in den verschiedenen arthritischen Erkrankungsphasen.

Summary

Macrophages are key players in Rheumatoid Arthritis (RA) and provide the source of precursor cells for osteoclasts. Osteoclasts are bone resorbing cells responsible for the destruction of periarticular bone in rheumatoid lesions. Neurotransmitters of the sympathetic nervous system like acetylcholine (ACh), noradrenaline (NA) and vasoactive intestinal peptide (VIP) act as modulators of RA. Changes in local innervation induced by arthritis change local neurotransmitter composition and concentration and provide a novel regulatory environment for osteoclasts and their respective precursors, bone marrow-derived macrophages (BMM). This thesis therefore intended to analyze the influence of ACh, NA and VIP on intrinsic metabolic properties of BMM and their osteoclastogenic capacity in the context of various stages of a collagen type II-induced arthritis (CIA) model in DA rats.

Both, osteoclasts and BMM express receptors for and therefore respond to ACh, NA and VIP stimulation. We detected that gene expression is affected by CIA but the effects do not manifest on protein level as we have shown for adrenoceptors $\alpha 1D$, $\alpha 2B$, $\beta 2$, muscarinic ACh receptor M5 and the alternative VIP receptor PACAP receptor 1. Nevertheless, an influence of CIA on intracellular signaling cascades of these receptors cannot be excluded.

One striking observation of this thesis was the reduced number of isolated BMM after separation from native bone marrow via plastic adherence at the acute CIA stage in comparison to control BMM numbers. This observation was in strong contrast to enhanced numbers of myeloid cells (belonging to the macrophage proportion) in native bone marrow preparations, reflecting the enhanced need for immune cells in inflammatory conditions. As the reason for this observation we identified a strongly decreased adhesion of BMM to plastic induced by CIA in the acute stage of disease. This effect was accompanied by a strong reduction of adhesion to collagen type I and fibronectin in the chronic stage which may inhibit the *in vivo* migration of BMM and therefore prevent the induction of new inflammatory processes. NA inhibited adhesion to collagen type I and laminin in BMM from control animals whereas CIA BMM were anergic to NA stimulation. Translation into *in vivo* conditions suggests that local NA cannot prevent CIA BMM from migration and thus promotes inflammation. Oppositely, NA enhanced plastic adhesion of control BMM and had again no effect on CIA BMM. In CIA BMM, VIP instead leads to enhanced plastic adhesion possibly representing a compensatory mechanism. The results point to CIA as a modulator of NA-driven adhesion to plastic and other molecules of the extracellular matrix, like collagen type I and laminin. Furthermore, starting early after immunization, CIA initiates mechanisms

that lead to impaired proliferative activity exclusively at non- and low-inflammatory stages. Inflammatory conditions *in vivo* may override the underlying effects and restore or even enhance proliferation. Anti-proliferative effects of NA, ACh and VIP on BMM from control rats were altered and dampened by CIA. Regarding caspase 3/7 activity, CIA induced a switch in BMM reactivity towards stimulation with ACh, NA and VIP, clearly protecting BMM from apoptosis induced by these neurotransmitters. These data suggest that CIA stage-dependently induces changes in neurotransmitter reactivity of BMM leading to alterations in metabolic properties like adhesion, apoptosis and proliferation.

We also observed changes in osteoclastogenesis of BMM induced by CIA acting rather on activity than on differentiation. We detected inhibition of cathepsin K activity in the cell culture supernatant of osteoclasts generated from BMM of arthritic rats thereby possibly providing a countermeasure of the organism to prevent further bone destruction. Another regulatory mechanism which could prevent excessive osteoclast formation is the enhanced sensitivity of CIA osteoclasts to deprivation of M-CSF and RankL that was apparent early after induction of CIA. Although CIA clearly affects gene expression of osteoclast activity and differentiation markers in a time-dependent manner, those alterations do not become evident on cellular level.

Additionally, we suggest that NA and VIP have mostly protective effects preventing bone matrix degradation by inhibition of cathepsin K activity, an observation which is probably attributed to an increased cAMP signaling via G_s protein-coupled receptors. Oppositely, we report an enhancing effect of ACh on cathepsin K and resorptive activity presumably mediated via muscarinic receptors. Increased osteoclast numbers upon ACh stimulation and a dose-dependent decrease in osteoclast numbers and increased caspase 3/7 reactivity by NA/VIP stimulation corroborates the assumption of opposite effects of the cholinergic and adrenergic nervous system on *in vitro* osteoclastogenesis and consequently CIA severity. We suggest that CIA modulates sensitivity towards neurotransmitter stimulation in osteoclasts enabling adaptation to locally changing neurotransmitter concentrations during disease pathogenesis.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit hätte ohne die Unterstützung einer Vielzahl verschiedener Personen nicht in dieser Form vollendet werden können:

Zuallererst gilt mein Dank **Frau Prof. Dr. Susanne Grässel** (Abteilung Experimentelle Orthopädie am Universitätsklinikum Regensburg), die es mir ermöglicht hat meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich bin sehr dankbar für den großen Freiraum, den Sie mir dafür in den letzten Jahren zugestanden hat sowie die jederzeitige Diskussionsbereitschaft und ihre fachliche Unterstützung, die maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Auch die Förderung der Teilnahme an einer Vielzahl verschiedener Kongresse hat meine persönliche und fachliche Entwicklung sehr beeinflusst.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei **Herrn Prof. Dr. Rainer Straub** (Abteilung Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg) bedanken, der mich als Mentor durch die Zeit der Doktorarbeit begleitet hat. Sein unerschöpfliches Wissen zum Thema Rheumatoide Arthritis und seine fortwährende Bereitschaft zur Diskussion sowie die daraus resultierenden Ideen haben sehr zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Auch möchte ich mich bei **Herr Prof. Dr. Joachim Grifka** (Direktor der Orthopädischen Klinik und Poliklinik für die Universität Regensburg im Asklepios Zentrum Bad Abbach) für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation an seinem Institut anzufertigen.

Bei **Herr PD Dr. Richard Bauer** und **Frau Dr. Zsuzsa Jenei-Lanzl** möchte ich mich zum einen für die vielen hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen bedanken und zum anderen für ihre Freundschaft und die Vielzahl schöner und lustiger, gemeinsam verbrachter Momente.

Ein großer Dank gilt dem gesamten Laborteam der Orthopädie. Vor allem die hervorragende technische Unterstützung von **Frau Claudia Göttl** und **Frau Mandy Vogel** haben mich erfolgreich durch die Endphase der Dissertation geleitet. Ein besonderer Dank gilt auch **Frau Dr. Tanja Niedermair**, die parallel ihre Dissertation in der Orthopädie angefertigt hat und mich in den guten und vor allem den weniger guten Zeiten immer unterstützt hat.

Ich danke allen **Mitarbeitern des ZMB im Biopark** und auch der **AG Straub**, die mich als Neuling in Regensburg willkommen geheißen haben und mich oft nicht nur fachlich sondern auch freundschaftlich bis heute unterstützen!

Schlussendlich möchte ich mich bei **meinen Eltern** und bei meinem **Bruder Stefan** dafür bedanken, dass sie immer hinter mir gestanden und mich unterstützt haben und es somit überhaupt erst ermöglicht haben, dass ich heute an diesem Punkt stehe.

Es gibt noch eine ganze Vielzahl von Leuten, die durch Rat und Tat, Witz und ein jederzeit offenes Ohr einen großen Anteil an dieser Arbeit haben: Fanny, Hanna & Sylvia, Maike, Sarah und Sonja!

Selbständigkeitserklärung

“Ich, Dominique Muschter geboren am 29.01.1980 in Lauchhammer, erkläre hiermit, 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.

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

Ort, Datum

eigenhändige Unterschrift

des Promovenden

DOMINIQUE MUSCHTER

GEBOREN AM 29.01.1980 IN LAUCHHAMMER

Minoritenweg 26, 93047 Regensburg

| Telefon: 0941 37808936 | mobil +49 176 66661683 | dominique.muschter@gmx.de |

Curriculum vitae

Ausbildung und Schulischer Werdegang

- Seit 11/2014 wissenschaftliche Mitarbeiterin, Universitätsklinikum Regensburg, Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Abteilung plastisch-rekonstruktive Gesichtschirurgie
- Seit 06/2010 Dissertation „Modulation der zellulären Eigenschaften und Osteoklastogenese von Knochenmark-Makrophagen durch Kollagen Typ II-induzierte Arthritis und sympathische Neurotransmitterstimulation“, Universitätsklinikum Regensburg, Experimentelle Orthopädie, Betreuerin: Prof. Dr. Susanne Grässel
- 08/2008 – 12/2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin, Universität Greifswald, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung
- 10/2003 – 09/2008 Studium der Biochemie, Universität Greifswald, Abschluss: Diplom-Biochemikerin
- Diplomarbeit: „Der Einfluss von 5-Hydroxytryptophan auf Immunsuppression und Verhalten im chronischen Stress“, Universität Greifswald, Institut für Immunologie, Betreuerin: Prof. Dr. Christine Schütt
- 02/2003 – 09/2003 Physiklaborantin, Forschungszentrum Jülich, Institut für Werkstoffe und Verfahren der Energietechnik 2
- 09/1999 – 01/2003 Ausbildung zur Physiklaborantin, Forschungszentrum Jülich, Abschluss: Facharbeiter
- 1992 – 1999 Friedrich-Engels-Gymnasium Senftenberg, Abschluss: allg. Hochschulreife, Note: 1,8

Kongressbeiträge

- Präsentationen** Kongress der deutschen Gesellschaft für Rheumatologie 2013, Mannheim, Deutschland
- GEBIN Meeting 2013, Regensburg, Deutschland
- Immunobone Retreat 2013, Garmisch-Partenkirchen; 2012 Jena; 2011 Bad Nauheim, Deutschland

Poster Jahreskongress der European Calcified Tissue Society (ECTS) 2013, Lissabon, Portugal; 2012 Stockholm, Schweden

 Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Matrixbiologie (DGMB) 2013, Tübingen, Deutschland; 2012, Oxford, Grossbritannien

Stipendien und Preise

2013 Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Matrixbiologie für die Teilnahme am Jahreskongress der ECTS in Lissabon, Portugal

 Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Matrixbiologie für den Posterbeitrag zum Kongress der DGMB 2013

2012 Reisestipendium der GlaxoSmithKline-Stiftung für die Teilnahme am Jahreskongress der ECTS in Stockholm, Schweden

Veröffentlichungen

Muschter D, Schäfer N, Stangl H, Straub RH, Grässel S. Sympathetic Neurotransmitters Modulate Osteoclastogenesis and Osteoclast Activity in the Context of Collagen-Induced Arthritis. PLoS One. 2015 Oct 2;10(10):e0139726. doi: 10.1371/journal.pone.0139726.

Muschter D, Göttl C, Vogel M, Grifka J, Straub RH, Grässel S. Reactivity of rat bone marrow-derived macrophages to neurotransmitter stimulation in the context of collagen II-induced arthritis. Arthritis Res Ther. 2015 Jun 24;17:169. doi: 10.1186/s13075-015-0684-4

Stangl H, Springorum HR, Muschter D, Grässel S, Straub RH. Catecholaminergic-to-cholinergic transition of sympathetic nerve fibers is stimulated under healthy but not under inflammatory arthritic conditions. Brain Behav Immun. 2015 May;46:180-91. doi: 10.1016/j.bbi.2015.02.022. Epub 2015 Feb 28

Muschter D, Grässel S. Weißbuch Forschung in Orthopädie und Unfallchirurgie, Zukunftsperspektiven muskuloskelettaler Forschung: Grundlagen: Immunologie / Neuroimmunologie, Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie e. V., 2012,

Abstracts

D. Muschter, N. Schäfer, R.H. Straub, J.Grifka, S. Grässel. Collagen-induced Arthritis reduces osteoclast differentiation and activity and impairs reactivity to neurotransmitter stimuli in an experimental arthritis rat model, Bone Abstracts, Volume 1, Mai 2013.

D. Muschter, N. Schäfer, R.H. Straub, J.Grifka, S. Grässel. Collagen-induced arthritis impairs osteoclastogenesis and reactivity to sympathetic neurotransmitter stimuli in bone marrow-derived macrophages from DA rats, Brain Behavior and Immunity, Volume 29, Supplement, Februar 2013.

D. Muschter, N. Schäfer, R.H. Straub, J.Grifka, S. Grässel. Collagen-induced arthritis reduced osteoclastic differentiation capacity and reactivity to sympathetic neurotransmitter stimuli in bone marrow-derived macrophages from DA rats. Bone, Volume 50, Supplement 1, Mai 2012.

Abkürzungsverzeichnis

A.dest	Aqua bidest
ACh	Acetylcholin
ACPA	<i>anti-citrullinated peptide antibody</i>
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
Akt1	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APC	antigen-präsentierende Zelle
AR	Adrenozeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
BLM	basolaterale Membran
bp	<i>base pair</i>
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAII	Kohlensäureanhydrase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFA	komplettes Freund Adjuvant
ChAT	Cholinacetyltransferase
CIA	Kollagen Typ II-induzierte Arthritis
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COMP	<i>cartilage oligomeric matrix protein</i>
COX	Zyklooxygenase
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
csfR	<i>colony stimulating factor 1 receptor</i>
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CTR	Calcitoninrezeptor
CYB5A	<i>cytochrome b5</i>
DA	Dark Agouti
DAPI	4',6-diamidino-2-Phenylindol
DC-STAMP	<i>dendritic cell-specific transmembrane protein</i>
DMARDS	<i>disease-modifying anti-rheumatic drugs</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMR1	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
EULAR	<i>European League against Rheumatism</i>
EZM	extrazelluläre Matrix

Abkürzungsverzeichnis

FCGR3A	<i>low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-a</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FLIP	<i>FLICE inhibitory protein</i>
Foxo3	<i>Forkhead box protein O3</i>
FoxP3	<i>forkhead box P3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
FSD	funktionale sekretorische Domäne
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GWAS	<i>genome-wide association studies</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HMBG1	<i>high mobility group-box 1</i>
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
hu	human
i.m.	intramuskulär
IFA	inkomplettes Freund Adjuvant
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRAK1	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
Kb	Kilobase
KMM	Knochenmark-Makrophagen
mAChR	muskarinerger Acetylcholin-Rezeptor
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
Min.	Minute
MIP-1	<i>macrophage inflammatory protein 1</i>
MITF	<i>microphthalmia-induced transcription factor</i>
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
NA	Noradrenalin
nAChR	nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NEMO	<i>NFkB essential modulator</i>
NFATc1	<i>nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1</i>
NFkB	<i>nuclear factor of kB</i>
nm	Nanometer
NO	<i>nitric oxide</i>
NPY	Neuropeptid Y
NS	Nervensystem

Abkürzungsverzeichnis

NSAID	nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente
OPG	Osteoprotegerin
OSCAR	<i>osteoclast-associated receptor</i>
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclase-activating peptide</i>
PADI4	<i>peptidyl arginine deiminase type IV</i>
PBMC	periphere Blutmonozyten
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PIGF	<i>placental growth factor</i>
PNS	parasympathisches Nervensystem
POD	Peroxidase
pSTA5	<i>phosphorylated-signal transducer and activator of transcription 5</i>
PTHrP	<i>parathyroid hormone-related peptide</i>
PTPN22	<i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22, lymphoid</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RA	Rheumatoide Arthritis
RankL	<i>receptor activator of nuclear factor κB ligand</i>
RASF	RA Fibroblasten-ähnlicher Synoviozyt
RB	<i>ruffled border</i>
RF	Rheumafaktor
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RL	Resorptionslakune
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
Sek.	Sekunde
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SNS	sympathisches Nervensystem
SOS1	<i>Son of sevenless homologue 1</i>
SP	Substanz P
SSC	<i>side scatter</i>
STAT4	<i>signal transducer and activator of transcription 4</i>
Std.	Stunde
SZ	<i>sealing zone</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
Tg	transgen
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TH	Tyrosin-Hydroxylase
Th-Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TRAF1	<i>TNF receptor associated factor 1</i>
TRAP	tartrat-resistente saure Phosphatase

Abkürzungsverzeichnis

u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
u. v. m.	und viele mehr
v. a.	vor allem
VAChT	vesikulärer Acetylcholin-Transporter
VDCC	<i>voltage-dependent calcium channels</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VIP	vasoaktives intestinals Peptid
vs.	versus
w/v	<i>weight per volume</i>
z. B.	zum Beispiel
Z-DEVD-R110	bis-[N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide]
Z-Leu-Arg-AMC	Benzyloxycarbonyl-L-Leucyl-L-Arginine-4-methylcoumaryl-7-Amid

Literaturverzeichnis

1. Turesson C, O'Fallon WM, Crowson CS, Gabriel SE, Matteson EL. Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years. *Annals of the rheumatic diseases*. 2003;62(8):722-7.
2. Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2006;36(3):182-8.
3. Rudan I, Sidhu S, Papan A, Meng SJ, Xin-Wei Y, Wang W, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in low- and middle-income countries: A systematic review and analysis. *J Glob Health*. 2015;5(1):010409.
4. Symmons D, Turner G, Webb R, Asten P, Barrett E, Lunt M, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2002;41(7):793-800.
5. Arnold MB, Bykerk VP, Boire G, Haraoui BP, Hitchon C, Thorne C, et al. Are there differences between young- and older-onset early inflammatory arthritis and do these impact outcomes? An analysis from the CATCH cohort. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2014;53(6):1075-86.
6. Doran MF, Pond GR, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in incidence and mortality in rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, over a forty-year period. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(3):625-31.
7. Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, Doran MF, Turesson C, O'Fallon WM, et al. Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(1):54-8.
8. Waaler E. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939. *APMIS*. 2007;115(5):422-38; discussion 39.
9. Gioud-Paquet M, Auvinet M, Raffin T, Girard P, Bouvier M, Lejeune E, et al. IgM rheumatoid factor (RF), IgA RF, IgE RF, and IgG RF detected by ELISA in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1987;46(1):65-71.
10. Westwood OM, Nelson PN, Hay FC. Rheumatoid factors: what's new? *Rheumatology (Oxford, England)*. 2006;45(4):379-85.
11. Blass S, Engel JM, Burmester GR. The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1999;42(12):2499-506.
12. Klareskog L, Amara K, Malmstrom V. Adaptive immunity in rheumatoid arthritis: anticitrulline and other antibodies in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*. 2014;26(1):72-9.
13. Nielsen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(2):380-6.
14. Kay J, Upchurch KS. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2012;51 Suppl 6:vi5-9.
15. Turesson C, Jacobsson LT, Sturfelt G, Matteson EL, Mathsson L, Ronnelid J. Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptides are associated with severe extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007;66(1):59-64.
16. James EA, Rieck M, Pieper J, Gebe JA, Yue BB, Tatum M, et al. Citrulline-specific Th1 cells are increased in rheumatoid arthritis and their frequency is influenced by disease duration and therapy. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2014;66(7):1712-22.
17. Law SC, Street S, Yu CH, Capini C, Ramnorch S, Nel HJ, et al. T-cell autoreactivity to citrullinated autoantigenic peptides in rheumatoid arthritis patients carrying HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(3):R118.
18. Feitsma AL, van der Voort EI, Franken KL, el Bannoudi H, Elferink BG, Drijfhout JW, et al. Identification of citrullinated vimentin peptides as T cell epitopes in HLA-DR4-positive patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(1):117-25.
19. Eyre S, Bowes J, Diogo D, Lee A, Barton A, Martin P, et al. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2012;44(12):1336-40.

20. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet.* 2010;42(6):508-14.
21. Suzuki T, Ikari K, Yano K, Inoue E, Toyama Y, Taniguchi A, et al. PADI4 and HLA-DRB1 are genetic risks for radiographic progression in RA patients, independent of ACPA status: results from the IORRA cohort study. *PloS one.* 2013;8(4):e61045.
22. Hughes LB, Morrison D, Kelley JM, Padilla MA, Vaughan LK, Westfall AO, et al. The HLA-DRB1 shared epitope is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in African Americans through European genetic admixture. *Arthritis and rheumatism.* 2008;58(2):349-58.
23. Viatte S, Plant D, Bowes J, Lunt M, Eyre S, Barton A, et al. Genetic markers of rheumatoid arthritis susceptibility in anti-citrullinated peptide antibody negative patients. *Annals of the rheumatic diseases.* 2012;71(12):1984-90.
24. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrua C, Hajeer AH. Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. *Seminars in arthritis and rheumatism.* 2002;31(6):355-60.
25. Carrier N, Cossette P, Daniel C, de Brum-Fernandes A, Liang P, Menard HA, et al. The DERA HLA-DR alleles in patients with early polyarthritis: protection against severe disease and lack of association with rheumatoid arthritis autoantibodies. *Arthritis and rheumatism.* 2009;60(3):698-707.
26. van der Woude D, Lie BA, Lundstrom E, Balsa A, Feitsma AL, Houwing-Duistermaat JJ, et al. Protection against anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis is predominantly associated with HLA-DRB1*1301: a meta-analysis of HLA-DRB1 associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in four European populations. *Arthritis and rheumatism.* 2010;62(5):1236-45.
27. Hinks A, Barton A, John S, Bruce I, Hawkins C, Griffiths CE, et al. Association between the PTPN22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: further support that PTPN22 is an autoimmunity gene. *Arthritis and rheumatism.* 2005;52(6):1694-9.
28. Stanford SM, Bottini N. PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene. *Nature reviews Rheumatology.* 2014;10(10):602-11.
29. Elshazli R, Settin A. Association of PTPN22 rs2476601 and STAT4 rs7574865 polymorphisms with rheumatoid arthritis: A meta-analysis update. *Immunobiology.* 2015;220(8):1012-24.
30. Gu E, Lu J, Xing D, Chen X, Xie H, Liang J, et al. Rs7574865 polymorphism in signal transducers and activators of transcription 4 gene and rheumatoid arthritis: an updated meta-analysis of 28 case-control comparisons. *Int J Rheum Dis.* 2015;18(1):3-16.
31. Yang XK, Liu J, Liu J, Liang Y, Xu WD, Leng RX, et al. Associations Between PADI4 Gene Polymorphisms and Rheumatoid Arthritis: An Updated Meta-analysis. *Arch Med Res.* 2015.
32. Han TU, Bang SY, Kang C, Bae SC. TRAF1 polymorphisms associated with rheumatoid arthritis susceptibility in Asians and in Caucasians. *Arthritis and rheumatism.* 2009;60(9):2577-84.
33. Stark K, Straub RH, Blazickova S, Hengstenberg C, Rovensky J. Genetics in neuroendocrine immunology: implications for rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2010;1193:10-4.
34. Han TU, Cho SK, Kim T, Joo YB, Bae SC, Kang C. Association of an activity-enhancing variant of IRAK1 and an MECP2-IRAK1 haplotype with increased susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism.* 2013;65(3):590-8.
35. Morgan AW, Barrett JH, Griffiths B, Subramanian D, Robinson JI, Keyte VH, et al. Analysis of Fcγ receptor haplotypes in rheumatoid arthritis: FCGR3A remains a major susceptibility gene at this locus, with an additional contribution from FCGR3B. *Arthritis research & therapy.* 2006;8(1):R5.
36. Daha NA, Kurreeman FA, Marques RB, Stoeken-Rijsbergen G, Verduijn W, Huizinga TW, et al. Confirmation of STAT4, IL2/IL21, and CTLA4 polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism.* 2009;60(5):1255-60.
37. Stark K, Straub RH, Rovensky J, Blazickova S, Eiselt G, Schmidt M. CYB5A polymorphism increases androgens and reduces risk of rheumatoid arthritis in women. *Arthritis research & therapy.* 2015;17:56.

38. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 2004;75(2):330-7.
39. van Oene M, Wintle RF, Liu X, Yazdanpanah M, Gu X, Newman B, et al. Association of the lymphoid tyrosine phosphatase R620W variant with rheumatoid arthritis, but not Crohn's disease, in Canadian populations. *Arthritis and rheumatism.* 2005;52(7):1993-8.
40. Wesoly J, van der Helm-van Mil AH, Toes RE, Chokkalingam AP, Carlton VE, Begovich AB, et al. Association of the PTPN22 C1858T single-nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis phenotypes in an inception cohort. *Arthritis and rheumatism.* 2005;52(9):2948-50.
41. Kang CP, Lee HS, Ju H, Cho H, Kang C, Bae SC. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans. *Arthritis and rheumatism.* 2006;54(1):90-6.
42. Barton A, Bowes J, Eyre S, Spreckley K, Hinks A, John S, et al. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population. *Arthritis and rheumatism.* 2004;50(4):1117-21.
43. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis and rheumatism.* 2000;43(1):30-7.
44. Carty SM, Snowden N, Silman AJ. Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis? *Annals of the rheumatic diseases.* 2004;63 Suppl 2:ii46-ii9.
45. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Infection and rheumatoid arthritis: still an open question. *Current opinion in rheumatology.* 2011;23(4):352-7.
46. Koziel J, Mydel P, Potempa J. The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. *Curr Rheumatol Rep.* 2014;16(3):408.
47. McLean MH, Dieguez D, Jr., Miller LM, Young HA. Does the microbiota play a role in the pathogenesis of autoimmune diseases? *Gut.* 2015;64(2):332-41.
48. Taneja V. Arthritis susceptibility and the gut microbiome. *FEBS Lett.* 2014;588(22):4244-9.
49. Colmegna I, Alberts-Grill N. Parvovirus B19: its role in chronic arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2009;35(1):95-110.
50. Lunardi C, Tinazzi E, Bason C, Dolcino M, Corrocher R, Puccetti A. Human parvovirus B19 infection and autoimmunity. *Autoimmunity reviews.* 2008;8(2):116-20.
51. Halenius A, Hengel H. Human cytomegalovirus and autoimmune disease. *Biomed Res Int.* 2014;2014:472978.
52. Balada E, Vilardell-Tarres M, Ordi-Ros J. Implication of human endogenous retroviruses in the development of autoimmune diseases. *Int Rev Immunol.* 2010;29(4):351-70.
53. Toussiot E, Roudier J. Pathophysiological links between rheumatoid arthritis and the Epstein-Barr virus: an update. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme.* 2007;74(5):418-26.
54. Cornillet M, Verrouil E, Cantagrel A, Serre G, Nogueira L. In ACPA-positive RA patients, antibodies to EBNA35-58Cit, a citrullinated peptide from the Epstein-Barr nuclear antigen-1, strongly cross-react with the peptide beta60-74Cit which bears the immunodominant epitope of citrullinated fibrin. *Immunol Res.* 2015;61(1-2):117-25.
55. Baka Z, Buzas E, Nagy G. Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together. *Arthritis research & therapy.* 2009;11(4):238.
56. Finckh A, Turesson C. The impact of obesity on the development and progression of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2014;73(11):1911-3.
57. Ruiz-Esquide V, Sanmarti R. Tobacco and other environmental risk factors in rheumatoid arthritis. *Reumatol Clin.* 2012;8(6):342-50.
58. Straub RH, Kalden JR. Stress of different types increases the proinflammatory load in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy.* 2009;11(3):114.
59. Straub RH. Rheumatoid arthritis: Stress in RA: a trigger of proinflammatory pathways? *Nature reviews Rheumatology.* 2014;10(9):516-8.
60. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nature reviews Rheumatology.* 2013;9(1):24-33.

61. Akhavan MA, Madden L, Buysschaert I, Sivakumar B, Kang N, Paleolog EM. Hypoxia upregulates angiogenesis and synovial cell migration in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(3):R64.
62. Mauri C, Ehrenstein MR. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. B cells. *Arthritis research & therapy*. 2007;9(2):205.
63. Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis research & therapy*. 2007;9(1):202.
64. Lutzky V, Hannawi S, Thomas R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Dendritic cells. *Arthritis research & therapy*. 2007;9(4):219.
65. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(6):429-42.
66. Ballanti E, Perricone C, di Muzio G, Kroegler B, Chimenti MS, Graceffa D, et al. Role of the complement system in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis: relationship with anti-TNF inhibitors. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(10):617-23.
67. van Vollenhoven RF. Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. *Nature reviews Rheumatology*. 2009;5(10):531-41.
68. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2007;370(9602):1861-74.
69. Hu Y, Cheng W, Cai W, Yue Y, Li J, Zhang P. Advances in research on animal models of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2013;32(2):161-5.
70. Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, Vervordeldonk MJ, Holmdahl R, Baumans V, et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(8):1357-62.
71. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *The Journal of experimental medicine*. 1977;146(3):857-68.
72. Lorentzen JC, Klareskog L. Susceptibility of DA rats to arthritis induced with adjuvant oil or rat collagen is determined by genes both within and outside the major histocompatibility complex. *Scandinavian journal of immunology*. 1996;44(6):592-8.
73. Griffiths MM, Remmers EF, Cannon GW, McCall-Vinings S, Reese V, Elliott C, et al. MHC and non-MHC genes in the regulation of susceptibility to collagen-induced arthritis among DA, BB, and BN rats. *Transplant Proc*. 1999;31(3):1589.
74. Kamada H, Goto M, Matsuura S, Takaoka Y, Nagai H. Immunopharmacological studies on collagen-induced arthritis in dark Agouti (DA) rats. *Jpn J Pharmacol*. 1997;74(4):313-22.
75. Holmdahl R, Bockermann R, Backlund J, Yamada H. The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice--a model for rheumatoid arthritis. *Ageing Res Rev*. 2002;1(1):135-47.
76. Pizzolla A, Gelderman KA, Hultqvist M, Vestberg M, Gustafsson K, Mattsson R, et al. CD68-expressing cells can prime T cells and initiate autoimmune arthritis in the absence of reactive oxygen species. *European journal of immunology*. 2011;41(2):403-12.
77. Catchpole B, Staines NA, Hamblin AS. Antigen presentation of Type II collagen in rats. *Clinical and experimental immunology*. 2001;125(3):478-84.
78. Goldschmidt TJ, Holmdahl R. Anti-T cell receptor antibody treatment of rats with established autologous collagen-induced arthritis: suppression of arthritis without reduction of anti-type II collagen autoantibody levels. *European journal of immunology*. 1991;21(5):1327-30.
79. Holmdahl R, Vingsbo C, Malmstrom V, Jansson L, Holmdahl M. Chronicity of arthritis induced with homologous type II collagen (CII) in rats is associated with anti-CII B-cell activation. *Journal of autoimmunity*. 1994;7(6):739-52.
80. Taylor PC, Plater-Zyberk C, Maini RN. The role of the B cells in the adoptive transfer of collagen-induced arthritis from DBA/1 (H-2q) to SCID (H-2d) mice. *European journal of immunology*. 1995;25(3):763-9.
81. Kadowaki KM, Matsuno H, Tsuji H, Tunru I. CD4+ T cells from collagen-induced arthritic mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice. *Clinical and experimental immunology*. 1994;97(2):212-8.
82. Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine*. 2008;41(2):84-91.

83. Cai L, Yin JP, Starovasnik MA, Hogue DA, Hillan KJ, Mort JS, et al. Pathways by which interleukin 17 induces articular cartilage breakdown in vitro and in vivo. *Cytokine*. 2001;16(1):10-21.
84. Sekine C, Nanki T, Yagita H. Macrophage-derived delta-like protein 1 enhances interleukin-6 and matrix metalloproteinase 3 production by fibroblast-like synoviocytes in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2014;66(10):2751-61.
85. Schrier D, Gilbertsen RB, Lesch M, Fantone J. The role of neutrophils in type II collagen-induced arthritis in rats. *The American journal of pathology*. 1984;117(1):26-9.
86. Palmblad K, Erlandsson-Harris H, Tracey KJ, Andersson U. Dynamics of early synovial cytokine expression in rodent collagen-induced arthritis : a therapeutic study using a macrophage-deactivating compound. *The American journal of pathology*. 2001;158(2):491-500.
87. Toh ML, Bonnefoy JY, Accart N, Cochlin S, Pohle S, Haegel H, et al. A CSF-1 receptor monoclonal antibody has potent bone and cartilage protective effects in experimental arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2014.
88. Danks L, Komatsu N, Guerrini MM, Sawa S, Armaka M, Kollias G, et al. RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. *Annals of the rheumatic diseases*. 2015.
89. Sandya S, Achan MA, Sudhakaran PR. Multiple matrix metalloproteinases in type II collagen induced arthritis. *Indian J Clin Biochem*. 2009;24(1):42-8.
90. Svelander L, Erlandsson-Harris H, Astner L, Grabowska U, Klareskog L, Lindstrom E, et al. Inhibition of cathepsin K reduces bone erosion, cartilage degradation and inflammation evoked by collagen-induced arthritis in mice. *European journal of pharmacology*. 2009;613(1-3):155-62.
91. Doll F, Schwager K, Hemmerle T, Neri D. Murine analogues of etanercept and of F8-IL10 inhibit the progression of collagen-induced arthritis in the mouse. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(5):R138.
92. Tanaka K, Hashizume M, Mihara M, Yoshida H, Suzuki M, Matsumoto Y. Anti-interleukin-6 receptor antibody prevents systemic bone mass loss via reducing the number of osteoclast precursors in bone marrow in a collagen-induced arthritis model. *Clinical and experimental immunology*. 2014;175(2):172-80.
93. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Britti D, De Maio M, et al. Absence of endogenous interleukin-10 enhances the evolution of murine type-II collagen-induced arthritis. *Eur Cytokine Netw*. 2001;12(4):568-80.
94. Williams RO, Marinova-Mutafchieva L, Feldmann M, Maini RN. Evaluation of TNF-alpha and IL-1 blockade in collagen-induced arthritis and comparison with combined anti-TNF-alpha/anti-CD4 therapy. *J Immunol*. 2000;165(12):7240-5.
95. De Klerck B, Carpentier I, Lories RJ, Habraken Y, Piette J, Carmeliet G, et al. Enhanced osteoclast development in collagen-induced arthritis in interferon-gamma receptor knock-out mice as related to increased splenic CD11b+ myelopoiesis. *Arthritis research & therapy*. 2004;6(3):R220-31.
96. Jung S, Park YK, Lee H, Shin JH, Lee GR, Park SH. TGF-beta-treated antigen presenting cells suppress collagen- induced arthritis through the promotion of Th2 responses. *Exp Mol Med*. 2010;42(3):187-94.
97. Billiau A, Matthys P. Collagen-induced arthritis and related animal models: How much of their pathogenesis is auto-immune, how much is auto-inflammatory? *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2005;22(5):339-44.
98. Hietala MA, Jonsson IM, Tarkowski A, Kleinau S, Pekna M. Complement deficiency ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol*. 2002;169(1):454-9.
99. Wang Y, Kristan J, Hao L, Lenkoski CS, Shen Y, Matis LA. A role for complement in antibody-mediated inflammation: C5-deficient DBA/1 mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol*. 2000;164(8):4340-7.
100. Walker DG. Control of bone resorption by hematopoietic tissue. The induction and reversal of congenital osteopetrosis in mice through use of bone marrow and splenic transplants. *The Journal of experimental medicine*. 1975;142(3):651-63.
101. Muguruma Y, Lee MY. Isolation and characterization of murine clonogenic osteoclast progenitors by cell surface phenotype analysis. *Blood*. 1998;91(4):1272-9.

102. Tsurukai T, Takahashi N, Jimi E, Nakamura I, Udagawa N, Nogimori K, et al. Isolation and characterization of osteoclast precursors that differentiate into osteoclasts on calvarial cells within a short period of time. *J Cell Physiol.* 1998;177(1):26-35.
103. Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, et al. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *The Journal of experimental medicine.* 1999;190(12):1741-54.
104. Jacquin C, Gran DE, Lee SK, Lorenzo JA, Aguila HL. Identification of multiple osteoclast precursor populations in murine bone marrow. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2006;21(1):67-77.
105. Pugliese LS, Goncalves TO, Popi AF, Mariano M, Pesquero JB, Lopes JD. B-1 lymphocytes differentiate into functional osteoclast-like cells. *Immunobiology.* 2012;217(3):336-44.
106. Lorenzo J. Osteoclast precursor cells. *Adv Exp Med Biol.* 2007;602:77-82.
107. Gallois A, Lachuer J, Yvert G, Wierinckx A, Brunet F, Rabourdin-Combe C, et al. Genome-wide expression analyses establish dendritic cells as a new osteoclast precursor able to generate bone-resorbing cells more efficiently than monocytes. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2010;25(3):661-72.
108. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, et al. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature.* 1990;345(6274):442-4.
109. Pixley FJ, Stanley ER. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends in cell biology.* 2004;14(11):628-38.
110. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998;93(2):165-76.
111. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-42.
112. Taylor RM, Kashima TG, Knowles HJ, Athanasou NA. VEGF, FLT3 ligand, PlGF and HGF can substitute for M-CSF to induce human osteoclast formation: implications for giant cell tumour pathobiology. *Lab Invest.* 2012;92(10):1398-406.
113. Jules J, Shi Z, Liu J, Xu D, Wang S, Feng X. Receptor activator of NF- κ B (RANK) cytoplasmic IVVY535-538 motif plays an essential role in tumor necrosis factor- α (TNF)-mediated osteoclastogenesis. *The Journal of biological chemistry.* 2010;285(48):37427-35.
114. Jules J, Zhang P, Ashley JW, Wei S, Shi Z, Liu J, et al. Molecular basis of requirement of receptor activator of nuclear factor kappaB signaling for interleukin 1-mediated osteoclastogenesis. *The Journal of biological chemistry.* 2012;287(19):15728-38.
115. Moon SJ, Ahn IE, Jung H, Yi H, Kim J, Kim Y, et al. Temporal differential effects of proinflammatory cytokines on osteoclastogenesis. *International journal of molecular medicine.* 2013;31(4):769-77.
116. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis research & therapy.* 2007;9 Suppl 1:S1.
117. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000;97(4):1566-71.
118. Pathak JL, Bravenboer N, Verschueren P, Lems WF, Luyten FP, Klein-Nulend J, et al. Inflammatory factors in the circulation of patients with active rheumatoid arthritis stimulate osteoclastogenesis via endogenous cytokine production by osteoblasts. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA.* 2014;25(10):2453-63.
119. Choudhary S, Blackwell K, Voznesensky O, Deb Roy A, Pilbeam C. Prostaglandin E2 acts via bone marrow macrophages to block PTH-stimulated osteoblast differentiation in vitro. *Bone.* 2013;56(1):31-41.
120. Seriwatanachai D, Thongchote K, Charoenphandhu N, Pandaranandaka J, Tudpor K, Teerapornpuntakit J, et al. Prolactin directly enhances bone turnover by raising osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoprotegerin ratio. *Bone.* 2008;42(3):535-46.

121. Sims NA, Quinn JM. Osteoimmunology: oncostatin M as a pleiotropic regulator of bone formation and resorption in health and disease. *Bonekey Rep.* 2014;3:527.
122. Sims NA, Johnson RW. Leukemia inhibitory factor: a paracrine mediator of bone metabolism. *Growth Factors.* 2012;30(2):76-87.
123. Buehring B, Viswanathan R, Binkley N, Busse W. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update on effects and management. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(5):1019-30.
124. Cauley JA. Estrogen and bone health in men and women. *Steroids.* 2015;99(Pt A):11-5.
125. Gunnarsson O, Basaria S, Gignac GA. Cardiometabolic and skeletal risk factors in black men with prostate cancer starting androgen deprivation therapy. *Cancers (Basel).* 2015;7(2):679-87.
126. Reginster JY. Calcitonin for prevention and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* 1993;95(5A):44S-7S.
127. Xie H, Cui Z, Wang L, Xia Z, Hu Y, Xian L, et al. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis. *Nature medicine.* 2014;20(11):1270-8.
128. Zhao H, Liu X, Zou H, Dai N, Yao L, Gao Q, et al. Osteoprotegerin induces podosome disassembly in osteoclasts through calcium, ERK, and p38 MAPK signaling pathways. *Cytokine.* 2015;71(2):199-206.
129. Mierke DF, Pellegrini M. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein: model systems for the development of an osteoporosis therapy. *Curr Pharm Des.* 1999;5(1):21-36.
130. Potts JT, Gardella TJ. Progress, paradox, and potential: parathyroid hormone research over five decades. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2007;1117:196-208.
131. Lerner UH. Transforming growth factor-beta stimulates bone resorption in neonatal mouse calvariae by a prostaglandin-unrelated but cell proliferation-dependent pathway. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 1996;11(11):1628-39.
132. Shakir S, MacIsaac ZM, Naran S, Smith DM, Bykowski MR, Cray JJ, et al. Transforming growth factor beta 1 augments calvarial defect healing and promotes suture regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2015;21(5-6):939-47.
133. Mellis DJ, Itzstein C, Helfrich MH, Crockett JC. The skeleton: a multi-functional complex organ: the role of key signalling pathways in osteoclast differentiation and in bone resorption. *J Endocrinol.* 2011;211(2):131-43.
134. Nakashima T, Takayanagi H. New regulation mechanisms of osteoclast differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2011;1240:E13-8.
135. Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, et al. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature.* 2004;428(6984):758-63.
136. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 3):377-81.
137. Del Fattore A, Cappariello A, Teti A. Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. *Bone.* 2008;42(1):19-29.
138. Galson DL, Roodman GD. Pathobiology of Paget's Disease of Bone. *J Bone Metab.* 2014;21(2):85-98.
139. Ralston SH. Clinical practice. Paget's disease of bone. *N Engl J Med.* 2013;368(7):644-50.
140. Polyzos SA, Singhellakis PN, Naot D, Adamidou F, Malandrinos FC, Anastasilakis AD, et al. Denosumab treatment for juvenile Paget's disease: results from two adult patients with osteoprotegerin deficiency ("Balkan" mutation in the TNFRSF11B gene). *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(3):703-7.
141. Mirza F, Canalis E. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: SECONDARY OSTEOPOROSIS: PATHOPHYSIOLOGY AND MANAGEMENT. *Eur J Endocrinol.* 2015.
142. Paterson CR. Osteogenesis imperfecta and other heritable disorders of bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1997;11(1):195-213.
143. Komori T. Animal models for osteoporosis. *European journal of pharmacology.* 2015;759:287-94.
144. Maeda SS, Lazaretti-Castro M. An overview on the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(2):162-71.
145. Schett G, Gravallese E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nature reviews Rheumatology.* 2012;8(11):656-64.

146. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(5):1791-802.
147. Paniagua RT, Chang A, Mariano MM, Stein EA, Wang Q, Lindstrom TM, et al. c-Fms-mediated differentiation and priming of monocyte lineage cells play a central role in autoimmune arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(1):R32.
148. Adamopoulos IE, Sabokbar A, Wordsworth BP, Carr A, Ferguson DJ, Athanasou NA. Synovial fluid macrophages are capable of osteoclast formation and resorption. *J Pathol*. 2006;208(1):35-43.
149. Kim HR, Kim KW, Kim BM, Jung HG, Cho ML, Lee SH. Reciprocal activation of CD4+ T cells and synovial fibroblasts by stromal cell-derived factor 1 promotes RANKL expression and osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2014;66(3):538-48.
150. Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(5):364-71.
151. Kim HR, Kim KW, Jung HG, Yoon KS, Oh HJ, Cho ML, et al. Macrophage migration inhibitory factor enhances osteoclastogenesis through upregulation of RANKL expression from fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2011;13(2):R43.
152. Yago T, Nanke Y, Ichikawa N, Kobashigawa T, Mogi M, Kamatani N, et al. IL-17 induces osteoclastogenesis from human monocytes alone in the absence of osteoblasts, which is potently inhibited by anti-TNF-alpha antibody: a novel mechanism of osteoclastogenesis by IL-17. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;108(4):947-55.
153. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(12):1481-8.
154. Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(7):4858-64.
155. Li P, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Ma L, Boyce BF, Xing L. RANK signaling is not required for TNFalpha-mediated increase in CD11(hi) osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNFalpha-mediated inflammatory arthritis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2004;19(2):207-13.
156. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J*. 1991;10(13):4025-31.
157. Herrak P, Gortz B, Hayer S, Redlich K, Reiter E, Gasser J, et al. Zoledronic acid protects against local and systemic bone loss in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(7):2327-37.
158. Rosas-Ballina M, Tracey KJ. The neurology of the immune system: neural reflexes regulate immunity. *Neuron*. 2009;64(1):28-32.
159. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*. 2002;53(4):865-71.
160. Silbernagel S, Despopoulos A. *Taschenatlas der Physiologie*: Thieme Verlag; 2000.
161. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):595-638.
162. Rensing L, Koch M, Rippe B, Rippe V. *Mensch im Stress - Psyche, Körper, Moleküle*: Spektrum Akademischer Verlag; 2006.
163. Docherty JR. Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *European journal of pharmacology*. 1998;361(1):1-15.
164. Lorton D, Bellinger DL. Molecular Mechanisms Underlying beta-Adrenergic Receptor-Mediated Cross-Talk between Sympathetic Neurons and Immune Cells. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(3):5635-65.

165. Baillie GS, Sood A, McPhee I, Gall I, Perry SJ, Lefkowitz RJ, et al. beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(3):940-5.
166. Shen JX, Yakel JL. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol Sin*. 2009;30(6):673-80.
167. Budd DC, McDonald J, Emsley N, Cain K, Tobin AB. The C-terminal tail of the M3-muscarinic receptor possesses anti-apoptotic properties. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(21):19565-73.
168. Mistry R, Dowling MR, Challiss RA. An investigation of whether agonist-selective receptor conformations occur with respect to M2 and M4 muscarinic acetylcholine receptor signalling via Gi/o and Gs proteins. *British journal of pharmacology*. 2005;144(4):566-75.
169. Moody TW, Ito T, Osefo N, Jensen RT. VIP and PACAP: recent insights into their functions/roles in physiology and disease from molecular and genetic studies. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2011;18(1):61-7.
170. Muthu K, Iyer S, He LK, Szilagyi A, Gamelli RL, Shankar R, et al. Murine hematopoietic stem cells and progenitors express adrenergic receptors. *Journal of neuroimmunology*. 2007;186(1-2):27-36.
171. Sanders VM. The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: do we understand it yet? *Brain, behavior, and immunity*. 2012;26(2):195-200.
172. Nijhuis LE, Olivier BJ, de Jonge WJ. Neurogenic regulation of dendritic cells in the intestine. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(12):2002-8.
173. Dokur M, Boyadjieva N, Sarkar DK. Catecholaminergic control of NK cell cytolytic activity regulatory factors in the spleen. *Journal of neuroimmunology*. 2004;151(1-2):148-57.
174. Gosain A, Gamelli RL, DiPietro LA. Norepinephrine-mediated suppression of phagocytosis by wound neutrophils. *J Surg Res*. 2009;152(2):311-8.
175. Todman D. Henry Dale and the discovery of chemical synaptic transmission. *Eur Neurol*. 2008;60(3):162-4.
176. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*. 2007;131(6):1047-58.
177. Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999;26(3):198-205.
178. Beckmann J, Lips KS. The non-neuronal cholinergic system in health and disease. *Pharmacology*. 2013;92(5-6):286-302.
179. Kawashima K, Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life sciences*. 2003;74(6):675-96.
180. Eglen RM. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2006;26(3):219-33.
181. Fujii YX, Tashiro A, Arimoto K, Fujigaya H, Moriwaki Y, Misawa H, et al. Diminished antigen-specific IgG1 and interleukin-6 production and acetylcholinesterase expression in combined M1 and M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Journal of neuroimmunology*. 2007;188(1-2):80-5.
182. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 2003;421(6921):384-8.
183. Fahrenkrug J, Emson PC. Vasoactive intestinal polypeptide: functional aspects. *Br Med Bull*. 1982;38(3):265-70.
184. Winzell MS, Ahren B. Role of VIP and PACAP in islet function. *Peptides*. 2007;28(9):1805-13.
185. Henning RJ, Sawmiller DR. Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. *Cardiovasc Res*. 2001;49(1):27-37.
186. Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev*. 2004;56(2):249-90.
187. Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions. *Amino Acids*. 2013;45(1):25-39.
188. Yu M, Wang Z, Robinson NE. Prejunctional alpha 2-adrenoceptors inhibit acetylcholine release from cholinergic nerves in equine airways. *Am J Physiol*. 1993;265(6 Pt 1):L565-70.

189. Vanhoutte PM, Levy MN. Prejunctional cholinergic modulation of adrenergic neurotransmission in the cardiovascular system. *Am J Physiol.* 1980;238(3):H275-81.
190. Miao FJ, Lee TJ. Cholinergic and VIPergic innervation in cerebral arteries: a sequential double-labeling immunohistochemical study. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990;10(1):32-7.
191. Anastasiadis PZ, Bezin L, Gordon LJ, Imerman B, Blitz J, Kuhn DM, et al. Vasoactive intestinal peptide induces both tyrosine hydroxylase activity and tetrahydrobiopterin biosynthesis in PC12 cells. *Neuroscience.* 1998;86(1):179-89.
192. Mach DB, Rogers SD, Sabino MC, Luger NM, Schwei MJ, Pomonis JD, et al. Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience.* 2002;113(1):155-66.
193. Tabarowski Z, Gibson-Berry K, Felten SY. Noradrenergic and peptidergic innervation of the mouse femur bone marrow. *Acta Histochem.* 1996;98(4):453-7.
194. Bajayo A, Bar A, Denes A, Bachar M, Kram V, Attar-Namdar M, et al. Skeletal parasympathetic innervation communicates central IL-1 signals regulating bone mass accrual. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2012;109(38):15455-60.
195. Gajda M, Litwin JA, Tabarowski Z, Zagolski O, Cichocki T, Timmermans JP, et al. Development of rat tibia innervation: colocalization of autonomic nerve fiber markers with growth-associated protein 43. *Cells Tissues Organs.* 2010;191(6):489-99.
196. Asmus SE, Parsons S, Landis SC. Developmental changes in the transmitter properties of sympathetic neurons that innervate the periosteum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2000;20(4):1495-504.
197. Asmus SE, Tian H, Landis SC. Induction of cholinergic function in cultured sympathetic neurons by periosteal cells: cellular mechanisms. *Developmental biology.* 2001;235(1):1-11.
198. Eleftheriou F. Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(19-20):2339-49.
199. Cherruau M, Morvan FO, Schirar A, Saffar JL. Chemical sympathectomy-induced changes in TH-, VIP-, and CGRP-immunoreactive fibers in the rat mandible periosteum: influence on bone resorption. *J Cell Physiol.* 2003;194(3):341-8.
200. Kondo A, Togari A. In vivo stimulation of sympathetic nervous system modulates osteoblastic activity in mouse calvaria. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism.* 2003;285(3):E661-7.
201. Hill EL, Turner R, Elde R. Effects of neonatal sympathectomy and capsaicin treatment on bone remodeling in rats. *Neuroscience.* 1991;44(3):747-55.
202. Lips KS, Yanko O, Kneffel M, Panzer I, Kauschke V, Madzharova M, et al. Small changes in bone structure of female alpha7 nicotinic acetylcholine receptor knockout mice. *BMC Musculoskelet Disord.* 2015;16:5.
203. Grassel SG. The role of peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in cartilage and bone physiology and pathophysiology. *Arthritis research & therapy.* 2014;16(6):485.
204. Fonseca TL, Jorgetti V, Costa CC, Capelo LP, Covarrubias AE, Moulatlet AC, et al. Double disruption of alpha2A- and alpha2C-adrenoceptors results in sympathetic hyperactivity and high-bone-mass phenotype. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2011;26(3):591-603.
205. Arai M, Nagasawa T, Koshihara Y, Yamamoto S, Togari A. Effects of beta-adrenergic agonists on bone-resorbing activity in human osteoclast-like cells. *Biochimica et biophysica acta.* 2003;1640(2-3):137-42.
206. Ransjo M, Lie A, Mukohyama H, Lundberg P, Lerner UH. Microisolated mouse osteoclasts express VIP-1 and PACAP receptors. *Biochemical and biophysical research communications.* 2000;274(2):400-4.
207. Lundberg P, Lie A, Bjurholm A, Lehenkari PP, Horton MA, Lerner UH, et al. Vasoactive intestinal peptide regulates osteoclast activity via specific binding sites on both osteoclasts and osteoblasts. *Bone.* 2000;27(6):803-10.
208. Tanaka H, Tanabe N, Kawato T, Nakai K, Kariya T, Matsumoto S, et al. Nicotine affects bone resorption and suppresses the expression of cathepsin K, MMP-9 and vacuolar-type H(+)-ATPase d2 and actin organization in osteoclasts. *PloS one.* 2013;8(3):e59402.

209. Pongratz G, Straub R. The sympathetic nervous response in inflammation. *Arthritis research & therapy*. 2014;16(6):504.
210. Harle P, Mobius D, Carr DJ, Scholmerich 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 and rheumatism*. 2005;52(4):1305-13.
211. 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 journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14(13):2097-107.
212. Capellino S, Weber K, Gelder M, Harle P, Straub RH. First appearance and location of catecholaminergic cells during experimental arthritis and elimination by chemical sympathectomy. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(4):1110-8.
213. Jenei-Lanzl Z, Capellino S, Kees F, Fleck M, Lowin T, Straub RH. Anti-inflammatory effects of cell-based therapy with tyrosine hydroxylase-positive catecholaminergic cells in experimental arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013.
214. van Maanen MA, Stoof SP, van der Zanden EP, de Jonge WJ, Janssen RA, Fischer DF, et al. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor on fibroblast-like synoviocytes and in synovial tissue from rheumatoid arthritis patients: a possible role for a key neurotransmitter in synovial inflammation. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(5):1272-81.
215. van Maanen MA, Lebre MC, van der Poll T, LaRosa GJ, Elbaum D, Vervoordeldonk MJ, et al. Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors attenuates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(1):114-22.
216. Lindblad SS, Mydel P, Jonsson IM, Senior RM, Tarkowski A, Bokarewa M. Smoking and nicotine exposure delay development of collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(3):R88.
217. Yu H, Yang YH, Rajaiah R, Moudgil KD. Nicotine-induced differential modulation of autoimmune arthritis in the Lewis rat involves changes in interleukin-17 and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(4):981-91.
218. van Maanen MA, Stoof SP, Larosa GJ, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Role of the cholinergic nervous system in rheumatoid arthritis: aggravation of arthritis in nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit gene knockout mice. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(9):1717-23.
219. Westman M, Saha S, Morshed M, Lampa J. Lack of acetylcholine nicotine alpha 7 receptor suppresses development of collagen-induced arthritis and adaptive immunity. *Clinical and experimental immunology*. 2010;162(1):62-7.
220. Oke SL, Tracey KJ. The inflammatory reflex and the role of complementary and alternative medical therapies. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1172:172-80.
221. Grimsholm O, Rantapaa-Dahlqvist S, Dalen T, Forsgren S. Unexpected finding of a marked non-neuronal cholinergic system in human knee joint synovial tissue. *Neuroscience letters*. 2008;442(2):128-33.
222. Baek YH, Choi DY, Yang HI, Park DS. Analgesic effect of electroacupuncture on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: mediation by cholinergic and serotonergic receptors. *Brain Res*. 2005;1057(1-2):181-5.
223. McDougall JJ, Elenko RD, Bray RC. Cholinergic vasoregulation in normal and adjuvant monoarthritic rat knee joints. *J Auton Nerv Syst*. 1998;72(1):55-60.
224. Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Gomariz RP, et al. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2002;80(1):16-24.
225. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protocols*. 2007;2(5):1269-75.
226. Ahmed N, Vogel B, Rohde E, Strunk D, Grifka J, Schulz MB, et al. CD45-positive cells of haematopoietic origin enhance chondrogenic marker gene expression in rat marrow stromal cells. *International journal of molecular medicine*. 2006;18(2):233-40.

227. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Current protocols in immunology* / edited by John E Coligan [et al]. 2008;Chapter 14:Unit 14.1.
228. Lutter AH, Hempel U, Wolf-Brandstetter C, Garbe AI, Goettsch C, Hofbauer LC, et al. A novel resorption assay for osteoclast functionality based on an osteoblast-derived native extracellular matrix. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;109(5):1025-32.
229. Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, Dunstan C, Heymann D, Redini F. Regulation of osteoclast protease expression by RANKL. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;310(3):774-8.
230. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(9):2287-99.
231. Sud R, Spengler RN, Nader ND, Ignatowski TA. Antinociception occurs with a reversal in alpha 2-adrenoceptor regulation of TNF production by peripheral monocytes/macrophages from pro- to anti-inflammatory. *European journal of pharmacology*. 2008;588(2-3):217-31.
232. Roupe van der Voort C, Heijnen CJ, Wulffraat N, Kuis W, Kavelaars A. Stress induces increases in IL-6 production by leucocytes of patients with the chronic inflammatory disease juvenile rheumatoid arthritis: a putative role for alpha(1)-adrenergic receptors. *Journal of neuroimmunology*. 2000;110(1-2):223-9.
233. Lorton D, Bellinger DL, Schaller JA, Shewmaker E, Osredkar T, Lubahn C. Altered sympathetic-to-immune cell signaling via beta(2)-adrenergic receptors in adjuvant arthritis. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:764395.
234. Lauenstein HD, Quarcoo D, Plappert L, Schleh C, Nassimi M, Pilzner C, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor 1 mediates anti-inflammatory effects in allergic airway inflammation in mice. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2011;41(4):592-601.
235. Costa P, Auger CB, Traver DJ, Costa LG. Identification of m3, m4 and m5 subtypes of muscarinic receptor mRNA in human blood mononuclear cells. *Journal of neuroimmunology*. 1995;60(1-2):45-51.
236. Burstein ES, Hesterberg DJ, Gutkind JS, Brann MR, Currier EA, Messier TL. The ras-related GTPase rac1 regulates a proliferative pathway selectively utilized by G-protein coupled receptors. *Oncogene*. 1998;17(12):1617-23.
237. Kohn EC, Alessandro R, Probst J, Jacobs W, Brilley E, Felder CC. Identification and molecular characterization of a m5 muscarinic receptor in A2058 human melanoma cells. Coupling to inhibition of adenylyl cyclase and stimulation of phospholipase A2. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(29):17476-84.
238. Schett G, Firestein GS. Mr Outside and Mr Inside: classic and alternative views on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(5):787-9.
239. Hetland ML, Ejbjerg B, Horslev-Petersen K, Jacobsen S, Vestergaard A, Jurik AG, et al. MRI bone oedema is the strongest predictor of subsequent radiographic progression in early rheumatoid arthritis. Results from a 2-year randomised controlled trial (CIMESTRA). *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(3):384-90.
240. Dalbeth N, Smith T, Gray S, Doyle A, Antill P, Lobo M, et al. Cellular characterisation of magnetic resonance imaging bone oedema in rheumatoid arthritis; implications for pathogenesis of erosive disease. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(2):279-82.
241. Kaneko M, Tomita T, Nakase T, Ohsawa Y, Seki H, Takeuchi E, et al. Expression of proteinases and inflammatory cytokines in subchondral bone regions in the destructive joint of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2001;40(3):247-55.
242. Oduro KA, Jr., Liu F, Tan Q, Kim CK, Lubman O, Fremont D, et al. Myeloid skewing in murine autoimmune arthritis occurs in hematopoietic stem and primitive progenitor cells. *Blood*. 2012;120(11):2203-13.
243. Colmegna I, Diaz-Borjon A, Fujii H, Schaefer L, Goronzy JJ, Weyand CM. Defective proliferative capacity and accelerated telomeric loss of hematopoietic progenitor cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(4):990-1000.
244. Snowden JA, Kapoor S, Wilson AG. Stem cell transplantation in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*. 2008;41(8):625-31.

245. Proulx ST, Kwok E, You Z, Papuga MO, Beck CA, Shealy DJ, et al. Elucidating bone marrow edema and myelopoiesis in murine arthritis using contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(7):2019-29.
246. Choi HS, Ryu CJ, Choi HM, Park JS, Lee JH, Kim KI, et al. Effects of the pro-inflammatory milieu on the dedifferentiation of cultured fibroblast-like synoviocytes. *Mol Med Rep*. 2012;5(4):1023-6.
247. Saalbach A, Wetzig T, Haustein UF, Anderegg U. Detection of human soluble Thy-1 in serum by ELISA. Fibroblasts and activated endothelial cells are a possible source of soluble Thy-1 in serum. *Cell and tissue research*. 1999;298(2):307-15.
248. Neidhart M, Seemayer CA, Hummel KM, Michel BA, Gay RE, Gay S. Functional characterization of adherent synovial fluid cells in rheumatoid arthritis: destructive potential in vitro and in vivo. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(7):1873-80.
249. Tas SW, Quartier P, Botto M, Fossati-Jimack L. Macrophages from patients with SLE and rheumatoid arthritis have defective adhesion in vitro, while only SLE macrophages have impaired uptake of apoptotic cells. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006;65(2):216-21.
250. Liote F, Boval-Boizard B, Weill D, Kuntz D, Wautier JL. Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clinical and experimental immunology*. 1996;106(1):13-9.
251. Rinaldi N, Schwarz-Eywill M, Weis D, Leppelmann-Jansen P, Lukoschek M, Keilholz U, et al. Increased expression of integrins on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis in vitro correlates with enhanced binding to extracellular matrix proteins. *Annals of the rheumatic diseases*. 1997;56(1):45-51.
252. Davies LC, Rosas M, Smith PJ, Fraser DJ, Jones SA, Taylor PR. A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *European journal of immunology*. 2011;41(8):2155-64.
253. Gilman SC, Daniels JF, Wilson RE, Carlson RP, Lewis AJ. Lymphoid abnormalities in rats with adjuvant-induced arthritis. I. Mitogen responsiveness and lymphokine synthesis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1984;43(6):847-55.
254. Scatizzi JC, Hutcheson J, Pope RM, Firestein GS, Koch AE, Mavers M, et al. Bim-Bcl-2 homology 3 mimetic therapy is effective at suppressing inflammatory arthritis through the activation of myeloid cell apoptosis. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(2):441-51.
255. Perlman H, Liu H, Georganas C, Koch AE, Shamiyeh E, Haines GK, 3rd, et al. Differential expression pattern of the antiapoptotic proteins, Bcl-2 and FLIP, in experimental arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(12):2899-908.
256. Ortega E, Garcia JJ, De la Fuente M. Modulation of adherence and chemotaxis of macrophages by norepinephrine. Influence of ageing. *Molecular and cellular biochemistry*. 2000;203(1-2):113-7.
257. Reardon C, Duncan GS, Brustle A, Brenner D, Tusche MW, Olofsson PS, et al. Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(4):1410-5.
258. de la Fuente M, Delgado M, del Rio M, Garrido E, Leceta J, Hernanz A, et al. Vasoactive intestinal peptide modulation of adherence and mobility in rat peritoneal lymphocytes and macrophages. *Peptides*. 1994;15(7):1157-63.
259. Xiu F, Stanojcic M, Jeschke MG. Norepinephrine inhibits macrophage migration by decreasing CCR2 expression. *PloS one*. 2013;8(7):e69167.
260. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000;405(6785):458-62.
261. Delgado M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nature medicine*. 2001;7(5):563-8.
262. Haga T. Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences*. 2013;89(6):226-56.

263. Rameshwar P, Gascon P, Oh HS, Denny TN, Zhu G, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits the proliferation of bone marrow progenitors through the VPAC1 receptor. *Experimental hematology*. 2002;30(9):1001-9.
264. Brown SW, Meyers RT, Brennan KM, Rumble JM, Narasimhachari N, Perozzi EF, et al. Catecholamines in a macrophage cell line. *Journal of neuroimmunology*. 2003;135(1-2):47-55.
265. Josefsson E, Bergquist J, Ekman R, Tarkowski A. Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology*. 1996;88(1):140-6.
266. Abdalla EE. Modulation of human neutrophil apoptosis by gut hormones. *International journal of health sciences*. 2010;4(1):53-8.
267. Calafat M, Larocca L, Roca V, Hauk V, Pregi N, Nesse A, et al. Vasoactive intestinal peptide inhibits TNF-alpha-induced apoptotic events in acinar cells from nonobese diabetic mice submandibular glands. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(2):R53.
268. Ikic M, Jajic Z, Lazic E, Ivcevic S, Grubisic F, Marusic A, et al. Association of systemic and intra-articular osteoclastogenic potential, pro-inflammatory mediators and disease activity with the form of inflammatory arthritis. *International orthopaedics*. 2014;38(1):183-92.
269. Li P, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Ma L, Looney RJ, Ritchlin CT, et al. Systemic tumor necrosis factor alpha mediates an increase in peripheral CD11bhigh osteoclast precursors in tumor necrosis factor alpha-transgenic mice. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(1):265-76.
270. Okayasu M, Nakayachi M, Hayashida C, Ito J, Kaneda T, Masuhara M, et al. Low-density lipoprotein receptor deficiency causes impaired osteoclastogenesis and increased bone mass in mice because of defect in osteoclastic cell-cell fusion. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(23):19229-41.
271. Takeshita S, Namba N, Zhao JJ, Jiang Y, Genant HK, Silva MJ, et al. SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts. *Nature medicine*. 2002;8(9):943-9.
272. Skoumal M, Haberhauer G, Kolarz G, Hawa G, Woloszczuk W, Klingler A, et al. The imbalance between osteoprotegerin and cathepsin K in the serum of patients with longstanding rheumatoid arthritis. *Rheumatology international*. 2008;28(7):637-41.
273. Akchurin T, Aissiou T, Kemeny N, Prosk E, Nigam N, Komarova SV. Complex dynamics of osteoclast formation and death in long-term cultures. *PloS one*. 2008;3(5):e2104.
274. Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*. 1992;359(6395):552-4.
275. Olsen N, Sokka T, Seehorn CL, Kraft B, Maas K, Moore J, et al. A gene expression signature for recent onset rheumatoid arthritis in peripheral blood mononuclear cells. *Annals of the rheumatic diseases*. 2004;63(11):1387-92.
276. Ibrahim SM, Koczan D, Thiesen HJ. Gene-expression profile of collagen-induced arthritis. *Journal of autoimmunity*. 2002;18(2):159-67.
277. Booth G, Newham P, Barlow R, Raines S, Zheng B, Han S. Gene expression profiles at different stages of collagen-induced arthritis. *Autoimmunity*. 2008;41(7):512-21.
278. Shou J, Bull CM, Li L, Qian HR, Wei T, Luo S, et al. Identification of blood biomarkers of rheumatoid arthritis by transcript profiling of peripheral blood mononuclear cells from the rat collagen-induced arthritis model. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(1):R28.
279. Kishimoto Y, Fukumoto S, Nishihara S, Mizumura H, Hirai K, Teshima R. Gene expression relevant to osteoclastogenesis in the synovium and bone marrow of mature rats with collagen-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2004;43(12):1496-503.
280. Liu PS, Chen YY, Feng CK, Lin YH, Yu TC. Muscarinic acetylcholine receptors present in human osteoblast and bone tissue. *European journal of pharmacology*. 2011;650(1):34-40.
281. Costa P, Traver DJ, Auger CB, Costa LG. Expression of cholinergic muscarinic receptor subtypes mRNA in rat blood mononuclear cells. *Immunopharmacology*. 1994;28(2):113-23.
282. Guizzetti M, Costa P, Peters J, Costa LG. Acetylcholine as a mitogen: muscarinic receptor-mediated proliferation of rat astrocytes and human astrocytoma cells. *European journal of pharmacology*. 1996;297(3):265-73.

283. Kondo H, Takeuchi S, Togari A. beta-Adrenergic signaling stimulates osteoclastogenesis via reactive oxygen species. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2013;304(5):E507-15.
284. Sethi V, Rubinstein I, Kuzmis A, Kastrissios H, Artwohl J, Onyuksel H. Novel, biocompatible, and disease modifying VIP nanomedicine for rheumatoid arthritis. *Molecular pharmaceutics*. 2013;10(2):728-38.
285. Winding B, Wiltink A, Foged NT. Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptides and vasoactive intestinal peptide inhibit bone resorption by isolated rabbit osteoclasts. *Experimental physiology*. 1997;82(5):871-86.
286. Granholm S, Lundberg P, Lerner UH. Calcitonin inhibits osteoclast formation in mouse haematopoietic cells independently of transcriptional regulation by receptor activator of NF- κ B and c-Fms. *J Endocrinol*. 2007;195(3):415-27.
287. Nicholson GC, Moseley JM, Yates AJ, Martin TJ. Control of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production in osteoclasts: calcitonin-induced persistent activation and homologous desensitization of adenylate cyclase. *Endocrinology*. 1987;120(5):1902-8.
288. Dickson L, Finlayson K. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacology & therapeutics*. 2009;121(3):294-316.