

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

CHARAKTERISIERUNG UND ROLLE
INTRAADRENALER MAKROPHAGEN UND DENDRITISCHER ZELLEN
IM KONTEXT DER RELATIVEN NEBENNIERENINSUFFIZIENZ
IM ARTHRITIS-TIERMODELL DER RATTE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anita Krammetsvogl

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

CHARAKTERISIERUNG UND ROLLE
INTRAADRENALER MAKROPHAGEN UND DENDRITISCHER ZELLEN
IM KONTEXT DER RELATIVEN NEBENNIERENINSUFFIZIENZ
IM ARTHRITIS-TIERMODELL DER RATTE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anita Krammetsvogl

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer H. Straub

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Joachim Grifka

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2021

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | Einleitung | 6 |
| 2. | Material- und Medienliste | 10 |
| 2.1. | Geräte und Gebrauchsartikel | 10 |
| 2.2. | Verbrauchsartikel | 10 |
| 2.3. | Kits und Assays | 12 |
| 2.4. | Chemikalien und Reagenzien | 13 |
| 2.4.1. | Tierlabor | 13 |
| 2.4.2. | Zellkulturen | 13 |
| 2.5. | Lösungsmittel und gebrauchsfertige Medien | 15 |
| 2.6. | Lösungen, Medien, Puffer | 16 |
| 2.7. | Tiere | 18 |
| 3. | Methoden..... | 19 |
| 3.1. | Tiere und Arthritismodell der Ratte | 19 |
| 3.2. | Kultivierung von Nebennierenzellen | 20 |
| 3.3. | Kokulturen aus MHC-II-Rezeptor-positiven und -negativen Nebennierenzellen.... | 21 |
| 3.4. | Zytokinbestimmung | 24 |
| 3.5. | Kortikosteronmessung..... | 24 |
| 3.6. | Generierung dendritischer Zellen..... | 25 |
| 3.7. | Quantifizierung PKH26-gefärbter dendritischer Zellen im histologischen Schnitt. | 26 |
| 3.8. | Immunhistochemische Quantifizierung von neutrophilen Granulozyten | 27 |
| 3.9. | Klassifizierung von Mitochondrienschäden mittels Fluoreszenzfärbung | 28 |
| 4. | Ergebnisse | 29 |
| 4.1. | Einfluss intraadrenaler MHC-II-pos. Zellen auf die Glukokortikoidproduktion | 29 |
| 4.2. | Quantität von Chemokinen in Relation zu den MHC-II-positiven Zellen | 31 |
| 4.3. | Quantität von IL-1 β in Kokulturen aus adrenalen Zellen | 37 |
| 4.4. | Neutrophile Granulozyten in Nebennieren | 39 |
| 4.5. | Migrationsverhalten von KMDCs und dem Einfluss von CIA | 40 |
| 5. | Diskussion | 42 |
| 5.1. | Einfluss intraadrenaler MHC-II-pos. Zellen auf die Glukokortikoidproduktion | 42 |
| 5.2. | Die Rolle der Chemokine im Kontext der relativen Nebenniereninsuffizienz | 42 |
| 5.3. | IL-1 β im Zusammenspiel mit Chemokinen und der Glukokortikoidproduktion | 43 |
| 5.4. | Migrationsverhalten von KMDCs unter dem Einfluss von CIA..... | 43 |
| 5.5. | Neutrophile Granulozyten in Nebennieren von Ratten mit CIA..... | 44 |

| | |
|--|----|
| 5.6. Klassifizierung von Mitochondrienschäden..... | 44 |
| 5.7. Probleme und Limitationen..... | 45 |
| 6. Zusammenfassung..... | 45 |
| Tabellenverzeichnis..... | 46 |
| Abbildungsverzeichnis..... | 46 |
| Literaturverzeichnis..... | 48 |
| Eidesstattliche Erklärung..... | 51 |
| Danksagung..... | 52 |

Abkürzungen

| | |
|--------------------|--|
| ACTH | Adrenokortikotropes Hormon |
| Art.Nr. | Artikelnummer |
| CIA | Kollagen-induzierte Arthritis (Tiermodell) |
| DCs | Dendritische Zellen |
| DMARDs | Disease modifying anti-rheumatic drugs |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| (D-)PBS | (Dulbecco's) Phosphate Buffered Saline |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| Ggf. | Gegebenenfalls |
| HBSS | Hanks' Buffered Salt Solution |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HPA-Achse | Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse |
| HRP | Meerrettich (Horseradish) Peroxidase |
| IL-1 | Interleukin 1 |
| IL-6 | Interleukin 6 |
| KMDC-Medium | Medium für Knochenmarkszellen und dendritische Zellen |
| KMDCs | Dendritische Zellen, aus Knochenmarkszellen generiert |
| MHC-II-pos. Zellen | Zellen, die den MHC-II-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren |
| MW | Mittelwert |
| Pos. | Positiv |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| rGM-CSF | Recombinant granulocyte macrophage colony stimulating factor |
| TMB | Tetramethylbenzidin |

1. Einleitung

Rheumatoide Arthritis – Klinik, Pathophysiologie und Therapie

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch entzündliche systemische Erkrankung, welche sich klinisch zunächst vor allem in den Gelenken manifestiert (1). Dabei führen Entzündungsprozesse vor allem an den Hand- und Fußgelenken, aber auch an anderen Gelenken oder sogar Organen unbehandelt zu irreversiblen Langzeitschäden und Funktionseinschränkungen (2). Zu Beginn der Erkrankung dominieren Gelenkschmerzen und morgendliche Gelenksteife (3). Diese häufig symmetrisch auftretenden Erscheinungen und das Andauern der Symptomatik über mehr als sechs Wochen sind auch zwei wesentliche Kriterien zur möglichst frühen Diagnosestellung von RA (1, 3). Häufig können die Beschwerden allerdings erst zu einem späteren Zeitpunkt mittels Ultraschall, Röntgen oder Magnetresonanztomographie objektiviert werden (3). Zu sehen sind dann die Ursachen für die klinisch eingeschränkte Beweglichkeit, nämlich Veränderungen der knöchernen Strukturen, verkleinerte Gelenkspalten und Deformitäten (1). Serologische Tests können schon früh bei der Diagnostik helfen, sind aber nicht immer zuverlässig (3). Dies ist darin begründet, dass nicht bei jedem Patienten mit RA auch autoreaktive Antikörper nachgewiesen werden können, obwohl man von einer autoimmunen Genese ausgeht (2, 3). Relevant sind hierbei vor allem Rheumafaktoren und Antikörper gegen das zyklische citrullinierte Peptid, wobei letztere spezifisch für RA sind (3). Interessanterweise zeigt sich der Krankheitsverlauf bei einem Antikörpernachweis, sogenannter seropositiver RA, aggressiver als bei seronegativer RA (2). Außerdem werden das weibliche Geschlecht, Rauchen, und eine genetische Prädisposition zu den Risikofaktoren für einen rascheren Verlauf oder gar erst den Ausbruch von RA gezählt (1).

Die genaue und definitive Ätiologie von RA ist allerdings noch immer Gegenstand aktueller Forschung (2) und auch diese Arbeit beschäftigt sich mit einem Teil davon. Der chronischen Gelenksdestruktionen an knorpeligen und knöchernen Strukturen liegt pathophysiologisch eine Verdickung der Synovialmembran und eine zelluläre Zunahme der Synovia (Gelenksflüssigkeit) zugrunde (4). Insbesondere ist dort die Zahl der T-Zellen, die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine und die Aktivität der Fibroblasten erhöht (2). Außerdem ist ein komplexes und nach wie vor nicht vollständig erforschtes Zusammenspiel mehrerer endokriner Hormone, insbesondere Kortisol, für diese chronische Form der Arthritis von Bedeutung (5). Hierauf wird im Folgenden näher eingegangen.

Auch therapeutisch werden bei RA schon sehr lange Glukokortikoide, insbesondere Kortikosteroide, eingesetzt (6) und deren antiinflammatorische Wirkung ausgenutzt (7). Zum heutigen Stand allerdings sind Kortisolanaloga im therapeutischen Bereich zu Gunsten von krankheitsmodifizierenden Medikamenten (DMARDs) eher in den Hintergrund geraten (8). Lediglich zu Erkrankungs- und Therapiebeginn, wenn die Wirkung der DMARDs noch nicht eintritt, kommen Glukokortikoide wie Prednisolon noch zum Einsatz (8). DMARDs, wie zum Beispiel Methotrexat wirken auf verschiedenen Wegen immunsupprimierend und haben zusätzlich einen krankheitsverzögernden Effekt (8). Für eine adäquate Analgesie kommen zusätzlich nichtsteroidale Antirheumatika wie Ibuprofen und Diclofenac, gegebenenfalls Opioiden zum Einsatz (8). In der Praxis entstehen so komplexe Kombinationstherapien aus DMARDs, Glukokortikoiden und Analgetika individuell für jeden Patienten (8).

Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) und Entzündung

Kortisol kann nicht nur therapeutisch eingesetzt werden, denn in einer Entzündungssituation setzt der menschliche Organismus unter normalen Bedingungen auch körpereigenes Kortisol entsprechend dem Zytokinstimulus frei (9). Dies basiert auf dem Mechanismus einer hormonellen Achse zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere (9). Dabei führen verschiedene physiologische Reize wie zum Beispiel Licht und Temperaturveränderungen, aber auch Stress und Entzündung im Hypothalamus zur Ausschüttung von Corticotropin-releasing Hormon (10). Dies führt in der Hypophyse wiederum zur Produktion von adrenokortikotropen Hormon (ACTH), welches ein positiver Stimulus unter anderem für die Glukokortikoidsekretion in der Nebenniere ist (10). Diese Achse unterliegt im Gesunden einem Gleichgewicht, welches durch ständige Up- und Downregulation sowie durch einen direkten Feedbackmechanismus aufrechterhalten wird (10). Speziell in einer Entzündungssituation führen proinflammatorische Zytokine letztlich zu einer vermehrten Kortisolausschüttung (9). Ziel dieses Mechanismus ist es, das Entzündungsausmaß einzudämmen und die Immunreaktion adäquat zu regulieren (9).

Inadäquate Glukokortikoidsekretion

Bei chronischen Entzündungen aber wurde beobachtet, dass die Glukokortikoidkonzentrationen in Relation zum Entzündungsausmaß zu gering sind (11,12). Dabei zeigen Patienten mit RA im Vergleich zu Gesunden relativ hohe Plasmakonzentrationen an proentzündlichen Zytokinen, wie zum Beispiel Interleukin-6 (IL-6) und gleichzeitig jedoch eine im Vergleich zu Gesunden ähnliche Sekretion antientzündlichen Kortisols aus der

Nebenniere (13). Dieses bei der chronischen Arthritis beobachtete Nachlassen der Nebennierentätigkeit wird daher als inadäquate Sekretion im Verhältnis zum Entzündungsmaß oder auch als relative Nebenniereninsuffizienz beschrieben (13). Mit dem auch in dieser Arbeit verwendeten Tiermodell konnte in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass diese inadäquate Sekretion bei der chronischen Arthritis bereits relativ früh, nämlich ab Tag 5 nach Induktion der experimentellen Arthritis an der Ratte, auftritt (14). Die Tiere sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht arthritisch und dennoch ist die Glukokortikoidproduktion trotz erhöhter Entzündungsmarker im Plasma quasi normal (14).

Viele verschiedene Zytokine beeinflussen die adrenale Kortikosteronsekretion (15). Insbesondere IL-1 und IL-6 steigern die Glukokortikoidproduktion in der Nebenniere (16). Sowohl Makrophagen, als auch dendritischen Zellen sind fähig, diese Zytokine zu produzieren (15,17). An gesunden Probanden konnte gezeigt werden, dass die kurzfristige Gabe von IL-6 eine verstärkte Ausschüttung an Cortisol aus der Nebenniere verursacht, während eine langfristige wiederholte Gabe von IL-6 die Glukokortikoidausschüttung wieder auf Basalniveau senkt (18). Ebenso verringert sich die Antwort der HPA-Achse bei wiederholter Stimulation (19,20). Dieser Rückgang der Kortisolausschüttung bei mehrmaliger Darbietung des Zytokin-Stimulus ist auch bei der chronischen Arthritis zu beobachten (12).

Chemokine und Chemotaxis

Chemokine sind Proteine, gebildet von vielen verschiedenen und besonders entzündlich stimulierten Gewebszellen (21). Ihre Hauptaufgabe ist es, andere Zellen zur Migration (Chemotaxis) anzuregen (21). Im Kontext einer Entzündung betrifft dies insbesondere Leukozyten, welche im betroffenen Gewebereich zur Immunabwehr benötigt werden (21,22). Es gibt mannigfaltige Arten von Chemokinen und deren Rezeptoren (21). Bei chronischen Entzündungskrankheiten sind vor allem die CXC-Chemokine als relevant bekannt (22), wobei bisher noch kein Zusammenhang mit RA in der Literatur beschrieben ist.

Makrophagen und Zellmorphologien in endokrinen Organen

Unter Arthritisbedingungen, aber auch beim gesunden Organismus, befinden sich Makrophagen und dendritische Zellen ($\hat{=}$ MHC-II-Rezeptor-positive Zellen) in der Nebenniere (15,23). Auch in anderen endokrinen Drüsen, z.B. der Hypophyse sind MHC-II-Rezeptor-positive Zellen vorhanden, wo sie über die Sekretion von Zytokinen die

Hormonproduktion stimulieren (24). Welchen Effekt die intraadrenalen Makrophagen und dendritischen Zellen bewirken, ist noch nicht bekannt und Teil dieser Arbeit.

Außerdem wurden in früheren Arthritis-Experimenten der Arbeitsgruppe von Prof. Straub morphologische Veränderungen der Mitochondrien in der Nebenniere beobachtet (14). Dabei fiel eine Verdickung der Zellstrukturen und eine inhomogene Verteilung innerhalb der Mitochondrien auf (14). Die Zahl der aufgequollenen Mitochondrien nahm mit Fortschreiten der rheumatoiden Arthritis zu (14).

Fragestellung

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Rolle der intraadrenalen Makrophagen und dendritischen Zellen hinsichtlich deren Einfluss auf die adrenokortikale Glukokortikoidproduktion und deren Migrationsverhalten untersucht.

Weiterhin werden relevante Zyto- und Chemokine in ihrem Zusammenhang mit Kollagen-induzierter Arthritis (CIA) und der adrenalen Glukokortikoidsekretion näher exploriert.

Zusätzlich sollten die bereits bekannten Mitochondrien-Veränderungen in der Nebenniere bei RA tiefergehend klassifiziert werden.

Die vorliegende Promotion bildete die Grundlage für eine Publikation von Stangl et. al. aus dem Jahr 2020 (25).

2. Material- und Medienliste

2.1. Geräte und Gebrauchsartikel

| | | |
|---|--|-----------------------|
| Absaug-Pumpe | KNF Laboport (Freiburg) | |
| Accujet pro Pipettierhelfer | Brand (Wertheim) | Art.Nr. 26301 |
| Fluoreszenzmikroskop | Leica (Deutschland) | |
| Glasspritze: Microliter Syringes 1001 LT, 1 mL | Hamilton (Bonaduz, Schweiz) | P/N: 81 301/00 |
| Homogenisator: Ultra-Turrax T10 b | IKA (Staufen) | Art.Nr. 0003737000 |
| iMark Microplate Reader mit der Manager Software 6 | Biorad (Hercules, Kalifornien) | |
| Kryotom, Mikrotom | Leica (Deutschland) | |
| Lichtmikroskop | Zeiss (Göttingen) | Seriennr. 384200 2478 |
| MACS Multistand | Miltenyi Biotec | Art.Nr. 130-042-303 |
| Mehrkanal-Mikroliter- Transferpette | Brand (Wertheim) | |
| Mikroliterpipetten, verschiedene Dosierungen | Eppendorf (Hamburg) | |
| MiniMACS Separator | Miltenyi Biotec | Art.Nr. 130-042-102 |
| Schüttelinkubator: Gyro-Rocker Incubator S170 | Bibby Scientific (Staffordshire, USA) | |
| Shandon Cytospin 3 Zytozentrifuge | Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts) | |
| Shandon Plastic Coverplates | Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts) | Art.Nr. 72-110-017 |
| Tierwaage LP 2000 | Mettler Toledo (Ohio, USA) | |
| Zentrifuge Rotina 420 R | Hettich (Tuttlingen) | Art.Nr. 4706 |

2.2. Verbrauchsartikel

| | | |
|--|--|----------------------|
| Adhäsionsobjektträger SuperFrost Ultra Plus | Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts) | Art.Nr. J 38 00 AMNZ |
| Aspirationspipetten | Falcon, Corning (New York) | Art.Nr. 357501 |

| | | |
|--|--|----------------------|
| BD Microlance 3 Kanüle 20 G, gelb | Seidel medipool (Friedrichsthal) | Art.Nr. 303 005 |
| Bepanthen Augen- und Nasensalbe | Bayer (Leverkusen) | |
| Cell strainer EASY, 70 µm | Greiner Bio-One (Frickenhausen) | Art.Nr. 542 070 |
| Einmal-Insulinspritzen, 1mL | Braun (Melsungen) | Art.Nr. 9151141 |
| Einmalskalpelle, steril | Feather (Osaka) | No. 10 und 11 |
| Einmalspritzen, 5 mL | Seidel medipool (Friedrichsthal) | Art.Nr. 302770 |
| Falcon, konische Zentrifugenröhrchen, 50 mL | Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts) | Art.Nr. 10-788-561 |
| Falcon-Tubes | Corning (New York) | Art.Nr. 352070 |
| Filter Tips 0,5-20 µL | Sarsted (Nürmbrecht) | Art.Nr. 70.1116.210 |
| Menzel Mikroskop- Deckelgläschen | Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts) | Art.Nr. 15747592 |
| MS Columns | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) | Art.Nr. 130-042-201 |
| Nicht sterile Immuno 96-Well- Platten mit durchsichtigem flachem Boden | Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts) | Art.Nr. 3855 |
| nunc-Platten, 24 wells | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. Z721077 |
| Nunc TM Trägerplatte für Zellkultureinsätze | Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts) | Art.Nr. 141002 |
| Petri-TC-Schale 60 | Sarstedt (Nürmbrecht) | Art.Nr. 83.3901 |
| Pipettenspitzen, steril, PCR clean, mit Dualfilter | Eppendorf (Nürmbrecht) | Art.Nr. 0030 077.571 |
| Pre-Separation-Filter, 30 µm | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) | Art.Nr. 130-041-407 |
| Safe-Lock Tubes, 1,5 mL, PCR clean | Eppendorf (Nürmbrecht) | Art.Nr. 0030 123.328 |

| | | |
|--|--|---------------------|
| SafeSeal-Tips professional, 200 µL | Biozym (Hessisch Oldendorf) | Art.Nr. 770200 |
| Safety-Multifly, 20 G, 200 mm | Sarstedt (Nürmbrecht) | Art.Nr. 85.1637.035 |
| Shandon Filter Cards, white | Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts) | Art.Nr. 5991022 |
| S-Monovetten, 2,7 mL, K3 EDTA | Sarstedt (Nürmbrecht) | Art.Nr. 05-1167-001 |
| Spritzen Syringe-Filter, 0,22 µm | TPP (Trasadingen, Schweiz) | Art.Nr. 99722 |
| Stripetten, verschieden Größen | Costar, Corning (New York) | Art.Nr. 4488 |
| Tissue Culture Treated 6 Well Plates, Corning, Costar | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. CLS3516 |
| Urinbecher | Sarstedt (Nürmbrecht) | Art.Nr. 75.562.105 |
| Zellkultureinsätze, Porgengröße 0,4 µm | Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts) | Art.Nr. 141002 |

2.3. Kits und Assays

| | | |
|--|---|-----------------|
| Corticosteron Ratte/Maus ELISA | Demeditec Diagnostics (Kiel) | Art.Nr. DEV9922 |
| DuoSet ELISA Development System Rat CXCL1/CINC-1 | R&D Systems (Minneapolis) | Art.Nr. DY515 |
| DuoSet ELISA Development System Rat CXCL2/GRO beta/MIP-2/CINC-3 | R&D Systems (Minneapolis) | Art.Nr. DY525 |
| DuoSet ELISA Development System Rat CXCL3/GRO gamma/CINC-2/DCIP-1 | R&D Systems (Minneapolis) | Art.Nr. DY516 |
| DuoSet ELISA Development System Rat IL-1 beta/IL-1F2 | R&D Systems (Minneapolis) | Art.Nr. DY501 |
| DuoSet ELISA Development System Rat LIX | R&D Systems (Minneapolis) | Art.Nr. DY543 |
| PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. PKH26GL |

2.4. Chemikalien und Reagenzien

2.4.1. Tierlabor

| | | |
|--|--------------------------------------|----------------------|
| 37 % Formaldehydlösung | Merck (Darmstadt) | Art.Nr. 8.18708.1000 |
| Atipamezol (α 2-Adrenorezeptor-Antagonist) | Orion Pharma (Hamburg) | |
| Bovine Type II Collagen, Immunization Grade, 2 mg/mL | MD Biosciences (Zürich, Schweiz) | Art.Nr. 804001-Sol |
| Buprenorphin 0,3 mg/mL | Bayer (Leverkusen) | Art.Nr. 01498817 |
| Fentanyl (Opioidanalgetikum) | Janssen (Neuss) | |
| Flumazenil (Benzodiazepin-Antagonist) | Hexal (Holzkirchen) | |
| Freund Adjuvant | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. F5506 |
| Isofluran | Baxter (Deerfield, Illinois) | |
| Medetomidin (α 2-Adenorezeptor-Agonist) | Orion Pharma (Hamburg) | |
| Midazolam (Benzodiazepin) | Rotexmedica (Trittau) | |
| Naloxon (Opioidantagonist) | Ratiopharm (Ulm) | |

2.4.2. Zellkulturen

| | | |
|---|--------------------------------------|---------------------|
| 0,4%ige Ciprofloxacinlösung (Ciprobay) | Fresenius Kabi (Bad Homburg) | |
| 10.000 U Penicillin und 10 mg/mL Streptomycin in 0,9% NaCl (kurz Penicillin/Streptomycin) | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. P4333 |
| 200 mM Glutamin-Lösung | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. G3126 |
| Anti-MHC Class II (OX6) MicroBeads, rat | Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) | Art.Nr. 130-090-759 |

| | | |
|---|---|----------------------|
| Bovine Serum Albumine, cell culture grade | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. A9418 |
| Collagenase from Clostridium histolytikum | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. 9001-12-1 |
| DAPI Nucleic Acid Stain | Invitrogen detection technologies (Paisley) | Art.Nr. MP01306 |
| Deoxyribonuclease from bovine pancreas | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. D4527 |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) | Roth (Karlsruhe) | Art.Nr. 4984.2 |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. E6758 |
| Fetal Bovine Serum (FBS) | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. F2442 |
| Fluoreszenz Mounting-Medium | Dako (Hamburg) | Art.Nr. S3023 |
| HEPES | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. H3375 |
| Horse Serum, Donor Herd, H1270 | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. H1270 |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck (Darmstadt) | Art.Nr. 4984.2 |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) | Merck (Darmstadt) | Art.Nr. 1.04873.1000 |
| Lysepuffer | Qiagen (Hilden) | Art.Nr. 79216 |
| MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator for live cell imaging (M36008) | Invitrogen detection technologies (Paisley) | Art.Nr. MP36008 |
| MitoTracker Mitochondrien-Selective Probes | Invitrogen detection technologies (Paisley) | Art.Nr. MP07510 |
| Natriumchlorid (NaCl) | Roth (Karlsruhe) | Art.Nr. 9265.3 |
| Poly-D-Lysin Hydrobromid | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. P6407 |

| | | |
|--|--------------------------------------|----------------------|
| Recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rGM-CSF) | R&D Systems (Minneapolis) | Art.Nr. 215-GM |
| Rekombinantes Interleukin-4 (rIL-4) | R&D Systems (Minneapolis) | Art.Nr. R4000 |
| Saccharose | Merck (Darmstadt) | Art.Nr. 1.07687.1000 |
| Salzsäure (HCl) | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. 35328 |
| Synacthen 250 µg Injektionslösung | Sigma-Tau (München) | |
| Tissue-Tek O.C.T. Compound | Sakura Finetek (Niederlande) | Art.Nr. 4583 |
| Triton | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. X-100 |
| Tween | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. P137-9 |
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. M6250 |

2.5. Lösungsmittel und gebrauchsfertige Medien

| | | |
|--|---|----------------------|
| Alexa Fluor 546 | Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts) | Art.Nr. A11071 |
| F(ab') ₂ Fragment of Goat Anti-Rabbit | | |
| Anti-Neutrophil Elastase Antikörper | Abcam (Cambridge) | Art.Nr. ab21595 |
| Destilliertes/deionisiertes Wasser | | |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck (Darmstadt) | Art.Nr. 1.02952.1000 |
| Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM) | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. D5796 |
| Dulbeco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. D8662 |
| Goat Serum | Dako (Hamburg) | Art.Nr. X0907 |

| | | |
|---|---|---------------|
| Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. H6646 |
| RPMI-1640 Medium | Sigma-Aldrich bzw. Merck (Darmstadt) | Art.Nr. R8758 |

2.6. Lösungen, Medien, Puffer

Antagonisierung Narkose für eine Ratte mit 150g Körpergewicht

| | |
|--|---------|
| Flumazenil (Benzodiazepin-Antagonist) | 30 µg |
| Naloxon (Opioidantagonist) | 18 µg |
| Atipamezol (α 2-Adrenorezeptor-Antagonist) | 0,11 mg |

3x Blocklösung

| | |
|------------|--------|
| PBS | 89,7 % |
| BSA | 8 % |
| FBS | 1 % |
| Goat Serum | 1 % |
| Triton | 0,3 % |

Differenzierungsmedium für Knochenmarkszellen (KMDC-Medium)

| | |
|--------------------------|-------|
| RPMI-1640 Medium | |
| Glutamin | 2 mM |
| Penicillin/Streptomycin | 1 % |
| FBS | 10 % |
| HEPES | 10 mM |
| β -Mercaptoethanol | 50 µM |

Homogenisat für eine Ratte mit 150g Körpergewicht

| | |
|----------------------|--------|
| Freundsches Adjuvant | 150 µL |
| Kollagen Typ II | 150 µL |

Magnetic cell sorting buffer

D-PBS

| | |
|------|-------|
| BSA | 0,5 % |
| EDTA | 2 mM |

Narkosemedikation für eine Ratte mit 150g Körpergewicht

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Midazolam (Benzodiazepin) | 0,3 mg |
| Fentanyl (Opioidanalgetikum) | 0,75 µg |
| Medetomidin (α2-Rezeptor-Agonist) | 22,5 µg |

Stimulationsmedium

| | |
|-----------------------------|-------|
| DMEM | |
| Glutamin | 1 % |
| Penicillin/Streptomycin | 1 % |
| 0,4%ige Ciprofloxacinlösung | 0,4 % |
| BSA, cell culture grade | 0,2 % |

Transportmedium Nebennierenzellen

| | |
|-----------------------------|-------|
| HBSS | 88,6% |
| Penicillin/Streptomycin | 1 % |
| FBS | 10 % |
| 0,4%ige Ciprofloxacinlösung | 0,4 % |

Verdauulösung

| | |
|-------------------------|-----------|
| Transportmedium | |
| Collagenase | 3 mg/mL |
| BSA, cell culture grade | 5 mg/mL |
| Deoxyribonuclease | 0,1 mg/mL |

Waschpuffer

| | |
|----------------------|---------|
| Deionisiertes Wasser | 89,95 % |
| 10x PBS | 10 % |
| Tween | 0,05 % |

Zellkulturmedium Nebennierenzellen

| | |
|-----------------------------|-------|
| DMEM | |
| Glutamin | 1 % |
| Penicillin/Streptomycin | 1 % |
| 0,4%ige Ciprofloxacinlösung | 0,4 % |
| FBS | 2,5 % |
| Horse Serum | 15 % |

10x PBS

| | |
|---|--------------|
| Deionisiertes Wasser | 1 L |
| Natriumchlorid (NaCl) | 80 g |
| Kaliumchlorid (KCl) | 2 g |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | 14,4 g |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | 2,7 g |
| Ggf. Salzsäure (HCl) | bis pH = 7,4 |

2.7. Tiere

Die Arthritis-Experimente wurden mit weiblichen Dark-Agouti-Ratten im Alter von 8-10 Wochen durchgeführt. Diese wurden über Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen und stammten aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht (Hannover). Die Tiere entsprangen einer Inzucht-Reihe und verfügten über homozygote Autosomenpaare.

Es wurden bis zu fünf Ratten je Käfig bei konstanter Raumtemperatur von 20°C, 15-fachem Luftwechsel und einer mittleren Luftfeuchtigkeit von 60 % (Streubreite 40 – 75 %) gehalten. Die verwendeten Typ IV Käfige boten 1.800 cm² Grundfläche. Die Belichtung erfolgte in einem 12-Stunden-Rhythmus mit je 12 Stunden durchgehender Beleuchtung oder Dunkelheit. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Futter für Ratten (v1535-000, Ssniff) und Trinkwasser über 500 mL Kugeltränken. Alle Käfige wurden wöchentlich mit frischer Tierstreu (HW 300, Jelo) und vier Wattestäbchen aus reiner Baumwolle zum Spielen (Durchmesser 20 mm) bestückt.

3. Methoden

3.1. Tiere und Arthritismodell der Ratte

Für die Experimente wurde ein mehrfach bewährtes Tiermodell mit Ratten verwendet, das sich durch die Induktion einer Autoimmunreaktion mittels Kollagen Typ II in 8-10 Wochen alten weiblichen Dark-Agouti-Ratten (DA-Ratten) auszeichnet (26). Hierzu lag eine Tierversuchs-Genehmigung der Regierung der Oberpfalz vor (AZ 55.2-2532-2-413). Die Autoimmunität wiederum löste eine vor allem an den distalen Gelenken manifeste Arthritis aus, welche später chronifizierte (collagen induced arthritis = CIA). DA-Ratten eignen sich aufgrund einer erhöhten Suszeptibilität für Arthritis besonders gut für die Untersuchung der chronischen Form im Tiermodell (27). Zusätzlich zeigen weibliche Ratten eine stärkere Kollagen-induzierte arthritische Reaktion als männliche (28). Aus diesen Gründen wurden für diese Untersuchungen weibliche DA-Ratten bevorzugt.

Vor Beginn der Experimente wurde eine Akklimatisationszeit von mindestens einer Woche eingehalten. Die Ratten wurden für die Induktion der Arthritis in Narkose versetzt. Nach Inhalation eines Isofluran-Luftsauerstoffgemisches waren die Tiere für einige Sekunden ausreichend kurz hypnotisiert und relaxiert um die Narkosemedikation applizieren zu können. Diese besteht für ein 150 g schweres Tier aus 0,3 mg Midazolam (Benzodiazepin), 0,75 µg Fentanyl (Opioidanalgetikum) und 22,5 µg Medetomidin (α 2-Adrenorezeptor-Agonist) und wurde mit einer Insulinspritze in die gluteale Muskulatur verabreicht. Sobald die Narkose wirkte, wurden die Augen mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe (Bayer, Leverkusen) versorgt und die Tiere mit Papiertüchern abgedeckt, um ein rasches Auskühlen zu vermeiden.

Zur Immunisierung wurden 300 µL eines Homogenisats, welches zu gleichen Teilen aus Kollagen Typ II und inkomplettem Freund Adjuvant besteht, intradermal in die laterale Schwanzbasis gespritzt. Nachdem die Ratten durch eine farbliche Markierung am Schwanz gekennzeichnet wurden, wurde die Narkose bei einer 150 g schweren Ratte mit 0,11 mg Atipamezol (α 2-Adrenorezeptor-Antagonist), 30 µg Flumazenil (Benzodiazepin-Antagonist) und 18 µg Naloxon (Opioidantagonist) subcutan antagonisiert und die Tiere während der Aufwachphase beobachtet. Ab Tag 14 nach Immunisierung traten die ersten klinischen Symptome der Arthritis an den Pfoten auf, sodass eine Schmerzmedikation mit 0,3 mg/mL Buprenorphin im 0,15 % Saccharose haltigen Trinkwasser indiziert war.

Während des Versuchs war eine tägliche Erhebung eines klinischen Scores mit einem Maximalwert von 16 Score-Punkten pro Tier notwendig. Dabei wurde an jeder Pfote der

Bereich des Sprung- bzw. Handgelenks, des Metatarsus bzw. Metacarpus und der Finger bzw. Zehen in einer Abstufung von 0,25, 0,5, 0,75 und 1 proportional zum Ausmaß der Pathologie einzeln beurteilt und zusätzlich jeweils ein weiterer Punkt je Pfote im Falle einer Schonhaltung vergeben. Daneben wurde täglich eine Kontrolle des allgemeinen Zustands und des Körpergewichts durchgeführt.

3.2. Kultivierung von Nebennierenzellen

Für die Zellisolation wurden die Tiere zunächst durch Asphyxie mittels CO₂ getötet und unmittelbar danach das Blut aus dem linken Ventrikel in eine EDTA-Monovette für spätere Untersuchungen des Plasmas überführt. Anschließend wurden die Nebennieren freipräpariert, gewogen und in einem mit Medium gefüllten Falcon-Tube auf Eis gelagert. Das hier verwendete Medium bestand aus Hank's Buffered Salt Solution (HBSS), 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) und 0,4 % Ciprofloxacinlösung (2 mg/mL Ciprobay). Unter einer sterilen Sicherheitswerkbank wurden die Nebennieren dreimal mit Medium gespült bevor sie mit einem Skalpell in einer Petrischale zerkleinert und je Nebenniere in etwa 1 mL Verdauungslösung aufgenommen wurden. Die Zellen konnten aufgrund der genetischen Identität der Tiere als ein großer Zellpool (Zellen aller Tiere zusammengegeben) behandelt werden, ohne dabei eine Immunreaktion zu provozieren. Die Verdauungslösung, bestehend aus Transportmedium (siehe oben), enthielt pro Milliliter folgende Zusätze: 3 mg Collagenase (*C. histolyticum*), 5 mg für die Zellkultur geeignetes Bovines Serum-Albumin (BSA) und 0,1 mg Desoxyribonuklease (DNase) aus boviner Pankreas.

Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C im Schüttelinkubator wurde die Zellsuspension durch ein 70 µm Zellsieb gefiltert und mit reichlich HBSS zum Verdaustop nachgespült. Nach 10 min Zentrifugieren bei 1200 U/min und 4 °C setzten sich die Zellen im Pellet ab, sodass der Überstand verworfen und die Erythrozyten mit 1-2 mL Lysepuffer (Qiagen) für 5 min lysiert werden konnte. Die Erythrozytenlyse wurde durch Zugabe von Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) gestoppt und erneut bei 1200 U/min und 4 °C für 10 min zentrifugiert.

Die Zellen wurden abschließend in Zellkulturmedium aufgenommen und mit Hilfe einer Zählkammer und Trypanblau gezählt. Das Zellkulturmedium für die Nebennierenzellen besteht aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) als Grundmedium, und dieses wurde mit 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0,4 % Ciprbay, 2,5 % FBS und 15 % Pferdeserum ergänzt.

3.3. Kokulturen aus MHC-II-Rezeptor-positiven und -negativen Nebennierenzellen

Zu verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufes (Tag 5, 28 und 40 nach Immunisierung) wurden die Nebennierenzellen aus arthritischen Ratten und aus Kontrolltieren gemäß der oben beschriebenen Methode gewonnen und als Kokulturen behandelt. Die Kombination zu Kokulturen von MHC-II-pos. Zellen aus arthritischen Tieren oder aus Kontrolltieren in verschiedenen Zellabstufungen erfolgte jeweils mit MHC-II-neg. Zellen oder unseparierten Nebennierenzellen gleichaltriger Kontrolltiere (Tab. 1). MHC-II-pos. Zellen in der Nebenniere sind in erster Linie Makrophagen und dendritische Zellen, MHC-II-neg. Zellen der Glukokortikoid produzierende Anteil. Tag 5 nach Immunisierung vertrat die subklinische Phase, Tag 28 repräsentierte die akute Arthritis und Tag 40 einen Zeitpunkt im bereits chronifizierten Stadium.

Tabelle 1: Übersicht Versuchsbedingungen Kokulturen

| | Bedingung 1 | Bedingung 2 | Bedingung 3 | Bedingung 4 |
|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| MHC-II pos. Zellen | Zellen aus Kontrolltieren | Zellen aus CIA Tag 5 Tieren | Zellen aus CIA Tag 28 Tieren | Zellen aus CIA Tag 40 Tieren |
| | + | + | + | + |
| MHC-II neg./ unseparierte Zellen | Zellen aus Kontrolltieren | Zellen aus Kontrolltieren | Zellen aus Kontrolltieren | Zellen aus Kontrolltieren |

Für diese Kokulturen wurden die isolierten Nebennierenzellen in MHC-II-positiv und MHC-II-negativ separiert. Dies geschah mittels eines magnetischen Verfahrens. Dazu ließ man 10^7 Nebennierenzellen zunächst in 80 μ L MACS-Puffer (magnetic cell sorting buffer: PBS mit 0,5 % BSA und 2 mM EDTA) zusammen mit 20 μ L Anti-Rat-MHC-II-MicroBeads für 15 Minuten bei 4-7°C inkubieren. Nach dem Stoppen der Markierung mittels 10 mL MACS-Puffer und dem Abzentrifugieren bei 300 xg für 10 Minuten waren die Zellen für die magnetische Separation gelabelt. Hierfür wurden diese in 500 μ L MACS-Puffer resuspendiert und zweimalig durch spezielle MS-Säulen geleitet, welche zuvor mit 500 μ L MACS-Puffer befeuchtet wurden. Beim ersten Durchgang wurde zusätzlich ein Pre-Separation-Filter mit 30

μm Porengröße verwendet. Vor dem zweiten Durchgang wurde das Zell-Puffer-Gemisch erneut zentrifugiert und neu in $500\ \mu\text{L}$ Puffer aufgenommen. Die zuletzt aufgefangene Zellsuspension enthielt dann fast ausschließlich MHC-II-neg. Zellen (= Negativfraktion). Die MHC-II-pos. Zellen (= Positivfraktion) wurden nach Entfernen des Magneten zweimalig mit MACS-Puffer durch mechanischen Druck mittels eines Einmalspritzen-Stempels aus der Säule herausgespült.

Nachdem die Zellen beider Fraktionen mit Trypanblau in einer Zählkammer gezählt wurden, wurden die Kokulturen angesetzt. Hierfür wurden am Vortag je $300\ \mu\text{L}$ /well $0,1\ \text{mg/mL}$ Poly-D-Lysin Hydrobromid in eine 24-well-Platte pipettiert und bei $4-7^\circ\text{C}$ übernacht inkubiert. Nach dem Waschen mit sterilem Wasser wurden in jede Kammer 150.000 MHC-II-neg. Zellen von Kontrolltieren mit je $400\ \mu\text{L}$ Medium gegeben. Anschließend wurden 16 Kammern mit Zellkultureinsätzen mit $4\ \mu\text{m}$ Porengröße bestückt, welche die beiden Zellarten räumlich voneinander trennen, jedoch einen Stoffaustausch durch die Membran ermöglichen sollten (Abb. 1). In diese Einsätze wurden die MHC-II-pos. Zellen aus arthritischen Tieren mit jeweils $200\ \mu\text{L}$ Medium gegeben. In den acht Kontrollkammern werden dementsprechend $200\ \mu\text{L}$ Nebennierenmedium ohne Zellen ergänzt. Die MHC-II-pos. Zellen werden in jeweils vier Kammern pro Bedingung folgendermaßen ausgesät: 15.000 Zellen, 30.000 Zellen, 75.000 Zellen und 150.000 Zellen (Tab. 2).

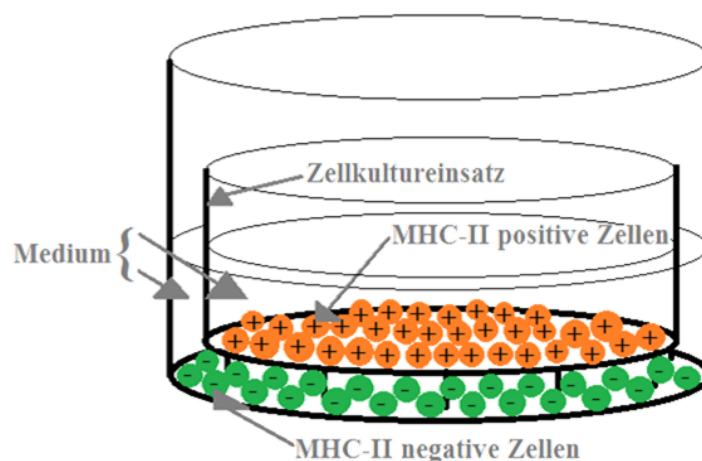


Abb. 1: Zellkultureinsatz in einer Zellkammer einer 24-well-Platte. Eine Membran mit $4\ \mu\text{m}$ Porengröße trennt die MHC-II-pos. von den MHC-II-neg. Zellen.

Tabelle 2: Schema der Kokulturen. In jede Zellkammer einer 24-well-Platte wurden zunächst 150.000 MHC-II-neg. Nebennierenzellen aus Kontrolltieren gegeben bevor die MHC-II-pos. Zellen nach obigem Schema ergänzt wurden.

| | | | | | |
|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| keine pos. Zellen | keine pos. Zellen | 15.000 pos. Zellen | 30.000 pos. Zellen | 75.000 pos. Zellen | 150.000 pos. Zellen |
| keine pos. Zellen | keine pos. Zellen | 15.000 pos. Zellen | 30.000 pos. Zellen | 75.000 pos. Zellen | 150.000 pos. Zellen |
| keine pos. Zellen | keine pos. Zellen | 15.000 pos. Zellen | 30.000 pos. Zellen | 75.000 pos. Zellen | 150.000 pos. Zellen |
| keine pos. Zellen | keine pos. Zellen | 15.000 pos. Zellen | 30.000 pos. Zellen | 75.000 pos. Zellen | 150.000 pos. Zellen |

Im Verlauf des Versuches wurden drei Medienwechsel durchgeführt, wobei am Tag 1 der entnommene Überstand verworfen und die abgenommenen Medien von Tag 2 und Tag 4 gepoolt bei -20 °C eingefroren wurden. Am Tag 4 wurden die MHC-II-pos. Zellen verworfen und die MHC-II-neg. Zellen mit je 30 µL/Kammer einer 8 M Synacthen-Lösung, einem Adrenokortikotropin(ACTH)-Analogon, plus 270 µL Medium stimuliert (Abb. 2). Das für diesen Schritt verwendete DMEM-Medium wurde ebenfalls mit 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,4 % Ciprobay ergänzt, anstelle von FBS und Pferdeserum jedoch 0,2 % Zellkultur geeignetes BSA verwendet. Nach sechs Stunden wurden die Zellüberstände erneut abgenommen und bis zur Bestimmung der Kortikosteronkonzentration bei -20 °C eingefroren.

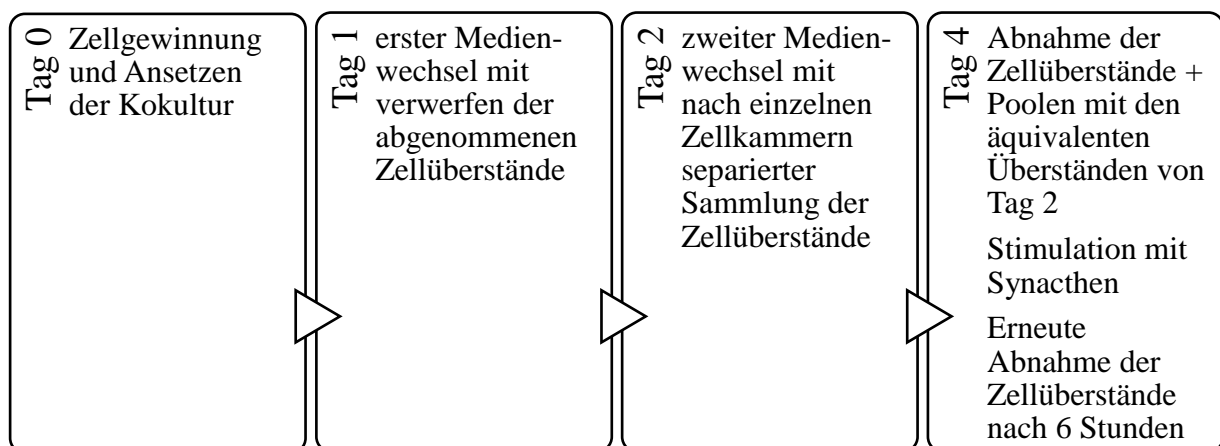


Abb. 2: Zeitlicher Ablauf der Kokulturen

3.4. Zytokinbestimmung

Aus den gefrorenen gepoolten Zellkulturüberständen des Zeitpunkts vor Stimulation mit Synacthen wurden mittels enzymgekoppelter Immunoassays (ELISAs) Interleukin 1 beta (IL-1 β) und die Chemokine LIX (Lipopolysaccharid-induziertes CXC Chemokin), CINC-1, CINC-2 und CINC-3 (CINC = Zytokin-induzierter Neutrophilen-Chemoattraktor) quantitativ bestimmt. Hierfür wurden zunächst 96-well-Platten mit dem jeweiligen Capture-Antikörper (DuoSet ELISA Kits, R&D Systems) bei 4-7°C für mindestens 12 Stunden beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (0,05 % Tween in PBS) wurden die Platten mit 1 % BSA in PBS für eine Stunde geblockt. Dies sollte unspezifische Bindungen der Antikörper verhindern, welche zu falsch hohen Messungen hätten führen können. In die gut trocken geklopften Kammern wurden anschließend je 100 μ L der Proben bzw. Standardlösung pipettiert, welche nach zwei Stunden erneut dreimalig ausgewaschen wurden. Der Detektionsantikörper wurde ebenfalls in 100 μ L Mengen dosiert und für zwei Stunden inkubiert. Nach erneuten drei Waschgängen und einer 20-minütigen Inkubationsphase mit 100 μ L Streptavidin-HRP wurden die Platten ein letztes Mal in drei Durchgängen gewaschen. Die im Set enthaltene Substratlösung, bestehend aus Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Tetramethylbenzidine (TMB), wurde je nach Reaktionsgeschwindigkeit nach 3-20 Minuten mit Schwefelsäure gestoppt. Die Platten wurden unmittelbar nach dem Stopp bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Korrektur bei 570 nm mittels Microplate-Reader ausgelesen. Die einzelnen Enzym-Konzentrationen wurden mit Hilfe der Microplate Manager Software 6 anhand der gemessenen Absorptionen und den vom Hersteller angegebenen Standardkurven berechnet.

3.5. Kortikosteronmessung

Um einen möglichen Einfluss der DCs bzw. Makrophagen (= MHC-II-pos. Zellen) auf die Glukokortikoidausschüttung der Nebennierenzellen zu überprüfen, wurden die Zellen wie oben beschrieben am Tag 4 der Kokultur mit Synacthen stimuliert und anschließend die Kortikosteronmenge im Überstand quantifiziert. Kortikosteron ist das Glukokortikoid der Ratten und stellt das Pendant zum humanen Kortisol dar (29). Dies ist darin begründet, dass Ratten das für die Biosynthese von Kortisol essenzielle Enzym 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase nicht exprimieren, sodass vermehrt Kortikosteron gebildet wird (29).

Für die Bestimmung wurde ein Kortikosteron-ELISA-Kit verwendet und nach Protokoll durchgeführt. Dabei wurden in die Kammern je 10 µL der Proben bzw. des Standards pipettiert und mit je 100 µL Inkubationspuffer und 50 µL Enzymkonjugat (Kortikosteron konjugiert mit HRP) ergänzt. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur und anschließenden vier Waschgängen mit je 300 µL Waschlösung wurden 200 µL Substratlösung (TMB und H₂O₂) ebenfalls bei Raumtemperatur in 10-20 Minuten enzymatisch umgesetzt und die Reaktion mit je 50 µL Salzsäure gestoppt. Die Konzentrationen wurden wie bei den Zytokinbestimmungen mittels Microplate-Reader und zugehöriger Software über die Absorption bei 450 nm Wellenlänge gemessen und berechnet.

3.6. Generierung dendritischer Zellen

Aus Knochenmarksmakrophagen wurden zu drei verschiedenen Arthritiszeitpunkten (Tag 5, 28 und 40 nach Immunisierung) und aus Kontrolltieren dendritische Zellen (DCs) generiert. Hierfür wurden die Ratten zunächst wie bei der Kultivierung der Nebennierenzellen durch Asphyxie mittels CO₂ getötet. Anschließend wurden Femur und Tibia möglichst komplett frei von Gewebe präpariert und in sterilem eisgekühlten PBS transportiert. Unter einer sterilen Sicherheitswerkbank schnitt man die Knochenenden ab, sodass das Knochenmark mithilfe einer 20G-Kanüle und einer 5mL-Spritze mehrmals mit RPMI1640-Medium herausgespült und einem Falcon-Tube gesammelt werden konnte.

Nachdem die Zellsuspension über ein 70 µm Zellsieb gegeben wurde, wurde sie bei 1200 U/min und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach 2-5 min Erythrozytenlyse wurde die Reaktion mit PBS abgestoppt und erneut zentrifugiert. Nun wurden die Zellen in einem Differenzierungsmedium für DCs aus dem Knochenmark (KMDC-Medium), welches neben RPMI1640-Medium als Grundsubstanz 2 mM Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FBS, 10 mM HEPES und 50 µM β-Mercaptoethanol enthielt, aufgenommen und gezählt.

Für die Aussaat an Tag 0 wurde das KMDC-Medium mit 5 ng/mL rGM-CSF (recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor), 5 ng/mL rekombinantes Interleukin-4 (rIL-4) und 0,4 % Ciprobay ergänzt. Das modifizierte Medium wurde zu je 3 mL/well zusammen mit $1,5 \times 10^6$ Zellen in jede Kammer einer 6-well-Platte pipettiert. Die Zytokine rIL-4 und rGM-CSF dienten dazu, die Zellen in Richtung dendritische Zellen zu differenzieren (30). An Tag 3 wurde das Medium komplett abgesaugt und neu zugesetzt,

wobei ab diesem Zeitpunkt nur rGM-CSF und rIL-4, aber kein Ciprofloxacin mehr zugefügt wurden. Durch das Absaugen wurden nicht adhärenente Zellen des Knochenmarks, wie z.B. Lymphozyten, Granulozyten und tote Zellen entfernt, während Makrophagen und DC-Vorläuferzellen adhärenent blieben.

An Tag 6 erfolgte derselbe Medienwechsel wie an Tag 3, wobei das abgenommene Medium bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert und die im Pellet gesammelten Zellen, welche nun DC-Vorläuferzellen enthielten, in die Kulturen zurückgeführt wurden. An Tag 10 wurden die semiadhärenente Zellcluster durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit der Pipette geerntet und in Falcon-Tubes gesammelt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen analog zu Tag 0, aber ohne Ciprobay, in neuen Platten ausgesät. An Tag 12 fand jeweils ein Medienwechsel mit Rückführung der im Zentrifugationspellet gesammelten Zellen statt, wobei hier zur Reifung kein rIL-4 und nur noch 2,5 ng/mL rGM-CSF im Medium ergänzt wurden. An Tag 14 konnten dann die differenzierten DCs durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit der Pipette geerntet und gezählt werden. Zu diesem Zeitpunkt ist es möglich die KMDCs auch im Lichtmikroskop durch traubenartige Zellverbände und die für Dendriten typischen Ausläufer zu erkennen.

3.7. Quantifizierung PKH26-gefärbter dendritischer Zellen im histologischen Schnitt

Für die Untersuchung des Migrationsverhaltens von dendritischen Zellen in der experimentellen Arthritis wurden aus arthritischen Ratten und Kontrolltieren KMDCs generiert, gefärbt und Kontrolltieren intravenös appliziert. Zur Generierung der DCs wurde Knochenmark aus Tieren zu denselben Arthritiszeitpunkten wie bei den Kokulturen (Tag 5, 28 und 40) verwendet. Die KMDCs wurden mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff (PKH26, Sigma Aldrich) in einer Konzentration von 10 μ M gefärbt und den Kontrolltieren intravenös verabreicht.

Die Färbung wurde bei Raumtemperatur und mit etwa 20×10^6 Zellen durchgeführt. Nach Abzentrifugieren des Mediums bei 400xg für 5 Minuten wurden die Zellen in 1 mL Diluent C (Katalog Nummer CGLDIL, Sigma Aldrich) aufgenommen und mit 1 mL 20 μ M Färbelösung vorsichtig vermengt. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde die Färbung mit mindestens 2 mL 15%-Pferdeserum- und 2,5% FBS-haltigem DMEM gestoppt und nach erneutem Zentrifugieren in KMDC-Medium aufgenommen. Nach zusätzlichen zweimaligen

Waschgängen wurden die Zellen in PBS, dem Applikationsmedium, aufgenommen und bei Körpertemperatur transportiert.

Für die Injektion wurden die Tiere wie oben, unter Arthritismodell der Ratte beschrieben, narkotisiert. Die Applikation erfolgte mit einer 20G-Butterflykanüle und einer 1 mL-Insulinspritze in eine der drei Schwanzvenen. Um eine Vasodilatation herbeizuführen wurde der Schwanz zuvor mit warmem Wasser vorgewärmt. Einem Tier mit 150 g Körpergewicht wurden 20×10^6 KMDCs gespritzt. Nach der Injektion wurde die Narkose wie oben beschrieben antagonisiert und die Tiere während der Aufwachphase beobachtet. Nach einer Stunde wurden die Tiere durch Asphyxie mittels CO₂ getötet und die Nebennieren, die Milz und die inguinalen Lymphknoten entnommen.

Die Organe wurden über Nacht in 3,7 % Formaldehydlösung fixiert, bevor sie in eine 30 % Saccharoselösung mit PBS überführt wurden, um Gefrierartefakte zu vermeiden. Dort lagerten sie eine Woche im Dunkeln bevor sie mit flüssigem Stickstoff in Tissue-Tek zu Blöcken kryofixiert wurden. Die Blöcke wurden anschließend mit einem Kryotom in eine Dicke von 8-10 µm geschnitten, auf Adhäsionsobjektträger übertragen und mit Menzel-Gläsern abgedeckt. Eventuell vorhandene PKH26 positive KMDCs wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops quantifiziert. Dabei wurden je 17 zufällig ausgewählte Sichtfelder aus mindestens drei Schnitten pro Organ und Tier ausgezählt und auf die durchschnittliche Zelldichte pro Quadratmillimeter gemittelt.

3.8. Immunhistochemische Quantifizierung von neutrophilen Granulozyten

Um eine mögliche Infiltration der Nebennieren mit neutrophilen Granulozyten zu überprüfen wurden Nebennieren von Ratten zu den drei oben genannten Arthritiszeitpunkten (subklinisch, akut und chronisch) und von Kontrolltieren mittels Immunhistochemie auf das Vorhandensein dieser Zellen untersucht. Hierfür wurden Gefrierschnitte von Nebennieren nach demselben Schema wie bei der Quantifizierung PKH-26-gefärbter DCs angefertigt. Für die Färbung wurden die ungedeckelten Objektträger in ein Shandon Coverplate gestellt und mit je 1 mL PBS befeuchtet und anschließend für 45 Minuten mit 3x-Blocklösung (siehe Materialien und Medien) geblockt. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde der Primärantikörper Anti-Neutrophil-Elastase-Antikörper (Abcam Ab21595) in der Verdünnung 1:500 übernacht bei 4-7°C inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit 1 % BSA und 10 % Goat Serum in PBS verdünnt. Am Folgetag wurde der Primärantikörper mit 0,3% Triton-

haltiger Waschlösung aus PBS und reinem PBS mehrmals gewaschen bevor der Sekundärantikörper Alexa Fluor 546 (Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:500 appliziert wurde. Nach weiteren 90 Minuten unter Schutz vor Lichteinfluss wurde erneut mehrmals mit und ohne Triton gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte 1:50.000 verdünnt mit DAPI in PBS für 5 Minuten. Nach dreimaligem Waschen mit reinem PBS wurden die Objektträger mit Fluoreszenz Mounting Medium eingedeckelt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop, in dem je 17 zufällig ausgewählte Sichtfelder aus mindestens drei Schnitten pro Nebenniere gezählt und auf die durchschnittliche Zelldichte pro Quadratmillimeter gemittelt wurden.

3.9. Klassifizierung von Mitochondrienschäden mittels Fluoreszenzfärbung

Es wurde versucht mittels spezifischer Färbungen Mitochondrienschäden näher zu klassifizieren. Hierfür wurden Doppelfärbungen mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen (MitoTracker green und MitoSOX red, Invitrogen) durchgeführt. Der grüne Farbstoff sollte alle Mitochondrien und der rote Farbstoff selbige, allerdings nur in Anwesenheit von Superoxidradikalen, färben.

Die Zellisolation aus den Nebennieren von Ratten erfolgte nach demselben Schema wie für die Kokulturen, wobei die beiden Fraktionen MHC-II-pos. bzw. -neg. Zellen nicht voneinander getrennt wurden. Beide Färbungen wurden in PBS und bei 37°C durchgeführt. Dabei wurde die Grünfärbung in der Konzentration 200 nM und die Rotfärbung mit 5 µM durchgeführt. Die Inkubationszeit für den grünen Farbstoff betrug eine Stunde, die für den roten 10 Minuten. Nach der Färbung mit MitoTracker green folgte die Färbung mit MitoSOX red. Die Kernfärbung wurde anschließend mit 300 nM DAPI in PBS parallel mit 3,7 % Formaldehydfixierung bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle drei Färbeschritte wurden mit Zellkulturmedium für Nebennierenzellen gestoppt und mit jeweils dreimaligem Waschen mit PBS abgeschlossen.

Es wurden jeweils 150.000 Zellen in 150 µL PBS durch Zytospin (Shandon Zytozentrifuge) auf Glasobjektträgern gleichmäßig verteilt und nach dem Trocknen mit Fluoreszenz Mounting Medium unter Menzel-Deckgläsern eingeschlossen. Der Zytospin wurde bei 500 rpm für 5 Minuten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop bei 490 nm.

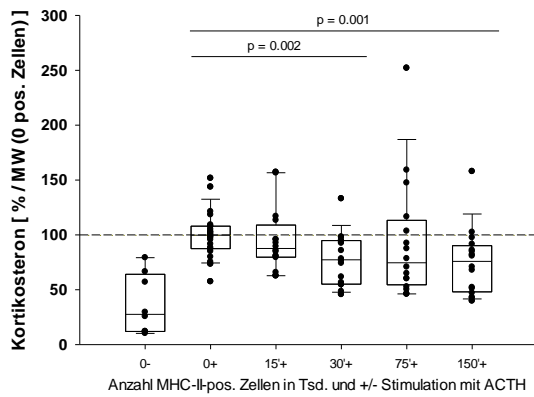
4. Ergebnisse

4.1. Einfluss intraadrenaler MHC-II-pos. Zellen auf die Glukokortikoidproduktion

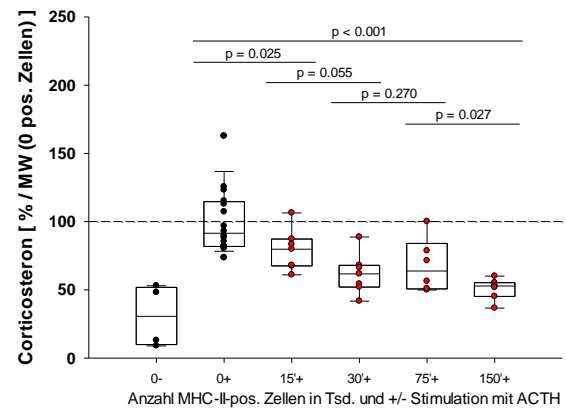
Vorausgegangene Experimente der AG Straub zeigten anhand eines Rattenmodells bereits einen quantitativen Anstieg adrener Immunzellen im Verlauf der CIA (Ergebnisse nicht abgebildet). Ein Zellkulturmodell mit KMDCs legte außerdem einen hemmenden Effekt dieser KMDCs auf die Glukokortikoidproduktion offen (Vorergebnisse ebenfalls nicht abgebildet).

Bei näheren, eigenen Untersuchungen ergab sich ein ähnliches Bild. Aus Nebennieren separierte MHC-II-pos. Zellen in Kokulturen mit MHC-II-neg. Nebennierenzellen zeigten einen hemmenden Effekt auf die Glukokortikoidproduktion. Dieser Effekt zeigte sich sowohl bei der Kultivierung von Zellen aus Kontrolltieren in beiden Zellfraktionen als auch von MHC-II-pos. Zellen, separiert aus Tieren mit CIA am Tag 5 und 40 nach Immunisierung. Interessanterweise konnte kein signifikanter Einfluss der MHC-II-pos. Nebennieren Zellen bei Separation dieser aus Tieren mit CIA am Tag 28 nach Immunisierung beobachtet werden. Ebenfalls führten höhere Zellzahlen der MHC-II-pos. Zellen vom CIA-Tag 40 dazu, dass keine Hemmung der Glukokortikoidsekretion mehr auftrat. Insgesamt war der hemmende Effekt bei MHC-II-pos. Zellen aus Tieren mit CIA am Tag 5 der Arthritis um ca. 20% stärker als bei Zellen aus Kontrolltieren (Abb. 3).

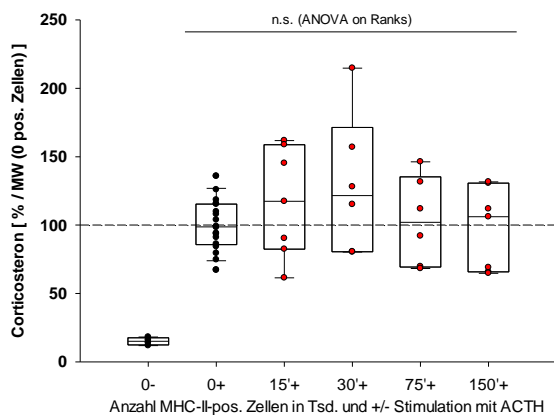
A)



B)



C)



D)

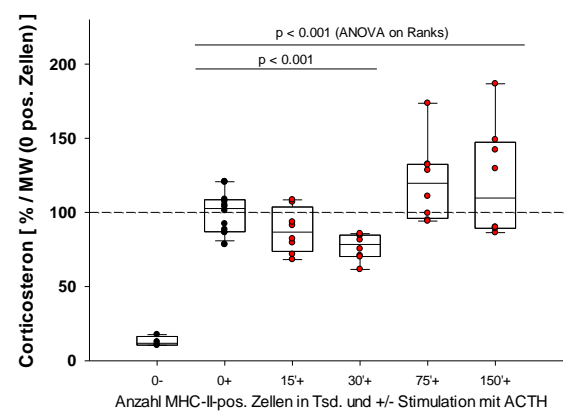


Abbildung 3: Prozentual, zum von 150.000 MHC-II-neg. Zellen produzierten Kortikosteron, gemessenes Kortikosteron in Zellkulturüberständen aus Kokulturen bestehend aus je 150.000 (150⁴) MHC-II-neg. Zellen aus Nebennieren von Kontrolltieren kultiviert mit verschiedenen Zellzahlen (Abszisse) MHC-II-pos. Zellen aus Nebennieren von A) Kontrolltieren, B) Tieren mit CIA am Tag 5 nach Immunisierung, C) Tieren mit CIA am Tag 28 nach Immunisierung und D) Tieren mit CIA am Tag 40 nach Immunisierung. Um zwei Gruppen zu vergleichen wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test angewendet, um alle Gruppen miteinander zu vergleichen der ANOVA on Ranks. Abkürzungen: MW, Mittelwert; 0 pos. Zellen, 0 MHC-II-pos. Zellen in der Kokultur; n.s., nicht signifikant; 0-, 0 MHC-II-pos. Zellen in der Kokultur und keine Stimulation der Glukokortikoidausschüttung mit ACTH.

Mit Kokulturen nach demselben Schema mit unseparierten Nebennierenzellen anstelle von MHC-II-neg. Zellen konnten die Ergebnisse nicht reproduziert werden. Hierbei war lediglich bei MHC-II-pos. Zellen aus Tieren mit CIA Tag 5 und mit CIA Tag 40 eine Hemmung des Kortikosteron zu verzeichnen (Abb. 4).

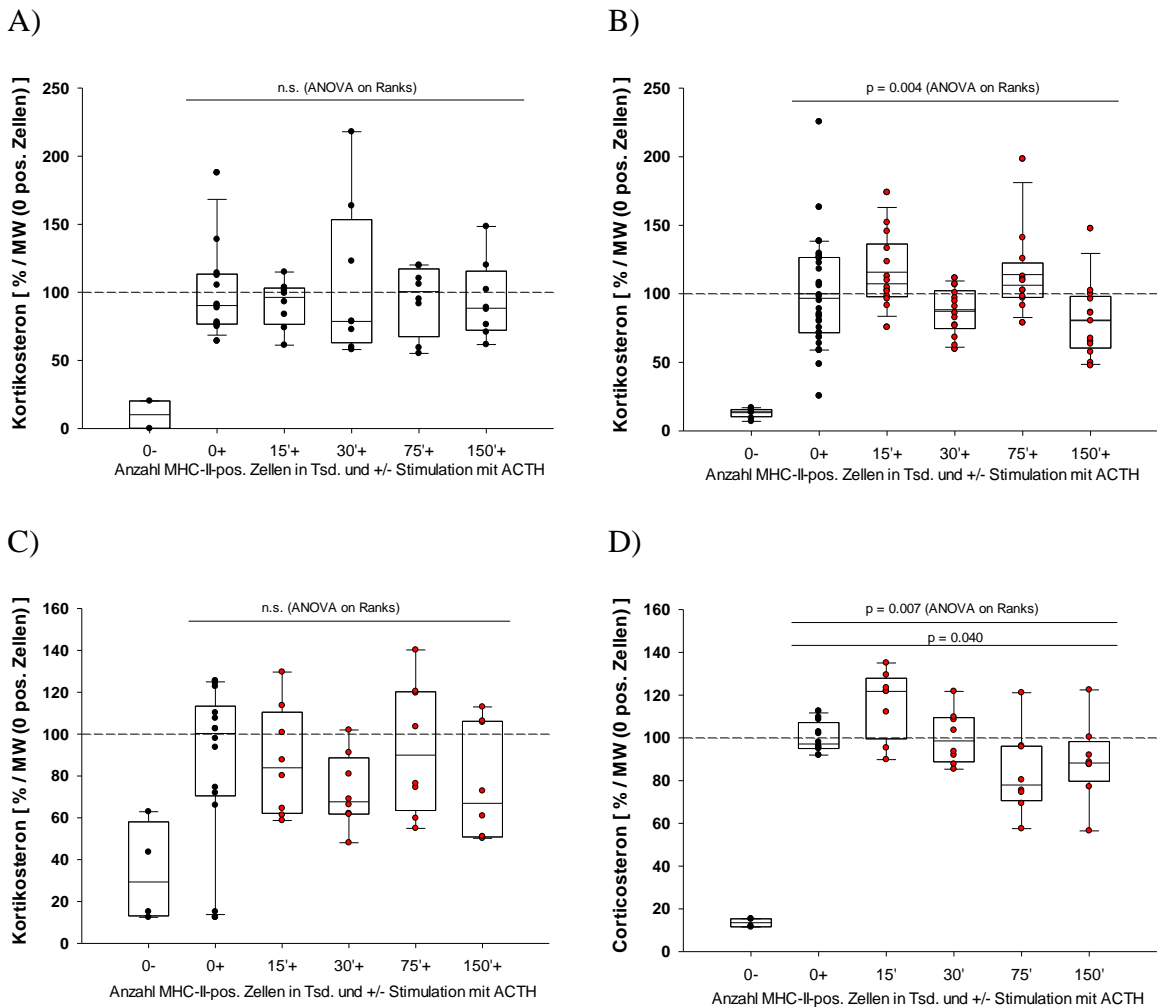


Abbildung 4: **Prozentual, zum von 150.000 unseparierten Nebennierenzellen produzierten Kortikosteron, gemessenes Kortikosteron in Zellkulturüberständen** aus Kokulturen bestehend aus je 150.000 (150') unseparierten Nebennierenzellen aus Kontrolltieren kultiviert mit verschiedenen Zellzahlen (Abszisse) MHC-II-pos. Zellen aus Nebennieren von A) Kontrolltieren, B) Tieren mit CIA am Tag 5 nach Immunisierung, C) Tieren mit CIA am Tag 28 nach Immunisierung und D) Tieren mit CIA am Tag 40 nach Immunisierung. Um zwei Gruppen zu vergleichen wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test angewendet, um alle Gruppen miteinander zu vergleichen der ANOVA on Ranks. Abkürzungen: MW, Mittelwert; 0 pos. Zellen, 0 MHC-II-pos. Zellen in der Kokultur; n.s., nicht signifikant; 0-, 0 MHC-II-pos. Zellen in der Kokultur und keine Stimulation der Glukokortikoidausschüttung mit ACTH.

4.2. Quantität von Chemokinen in Relation zu den MHC-II-positiven Zellen

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Straub wurden über einen Proteom Profiler vorwiegend die Chemokine CINC 1-3 und LIX nachgewiesen. Im Rahmen dieser vorhergehenden Experimente wurde außerdem gezeigt, dass die einzelnen Konzentrationen in arthritischen Tieren signifikant höher waren als in Kontrolltieren (25).

Zusätzlich zeigten die eigenen Versuche, dass mit zunehmender Anzahl an Makrophagen und DCs (\cong MHC-II-pos. Zellen) in Kokulturen mit MHC-II-neg. Zellen die Chemokinsekretion zunimmt (Abb. 5 – 8). Unter den gemessenen Chemokinen CINC 1-3 und LIX zeigte besonders CINC-2 eine stetige Progression in positiver Korrelation zur Anzahl der MHC-II-pos. Zellen (Abb. 6B). Auch absolut wurden die höchsten Konzentrationen bei CINC-2, insbesondere am CIA-Tag 28, gemessen (Daten nicht abgebildet).

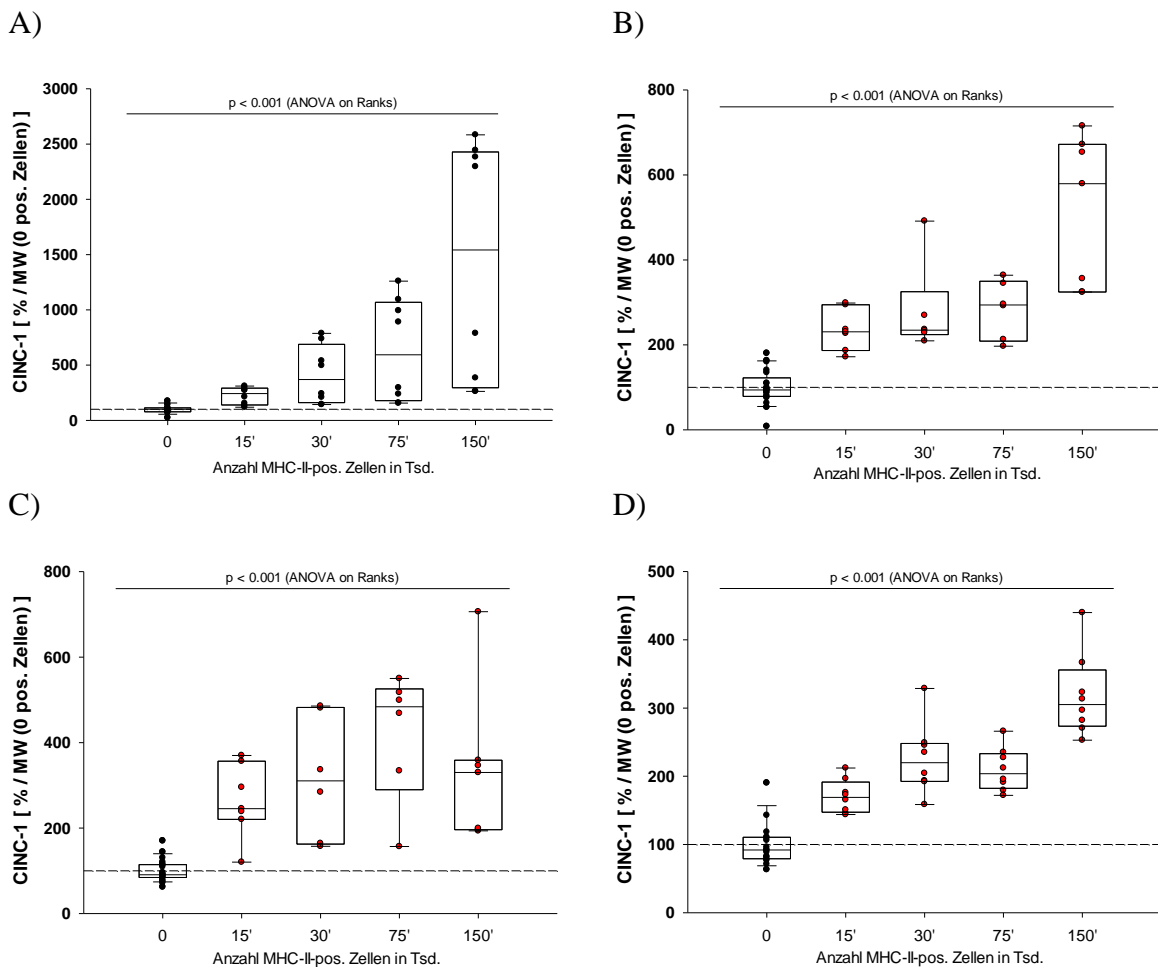
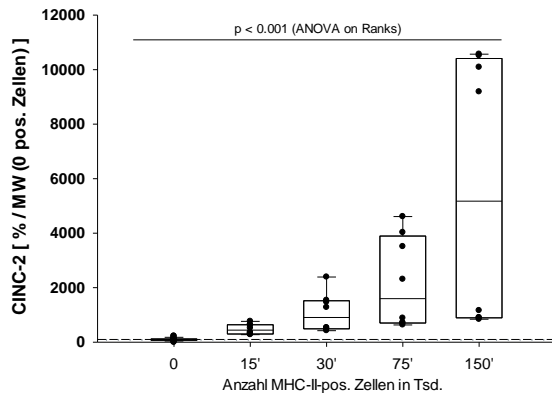
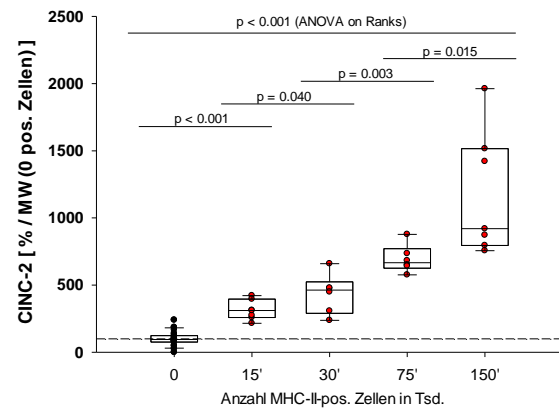


Abbildung 5: **Chemokin CINC-1 in den Zellkulturüberständen** von Kokulturen bestehend aus je 150.000 (150') MHC-II-neg. Zellen aus Nebennieren von Kontrolltieren kultiviert mit verschiedenen Zellzahlen (Abszisse) MHC-II-pos. Zellen aus Nebennieren von A) Kontrolltieren, B) Tieren mit CIA am Tag 5 nach Immunisierung, C) Tieren mit CIA am Tag 28 nach Immunisierung und D) Tieren mit CIA am Tag 40 nach Immunisierung. Die Signifikanztestung wurde mit ANOVA on Ranks durchgeführt. Abkürzungen: MW, Mittelwert; 0 pos. Zellen, 0 MHC-II-pos. Zellen in der Kokultur.

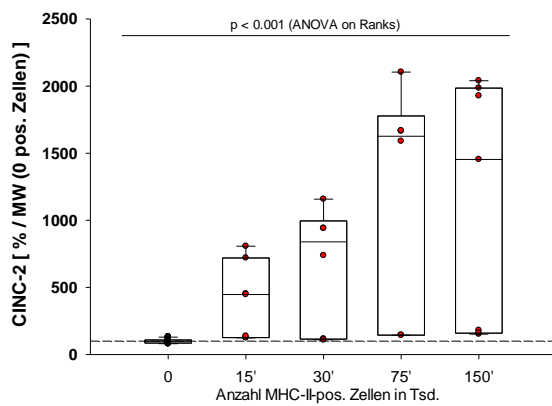
A)



B)



C)



D)

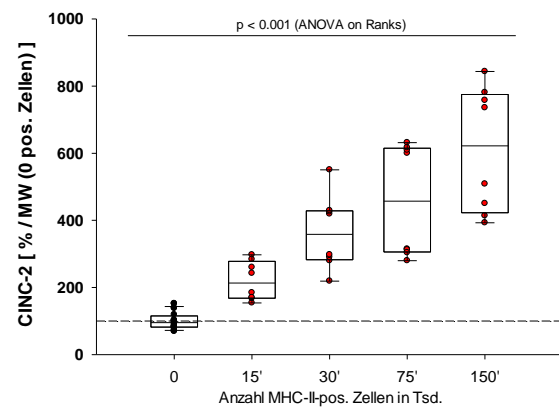
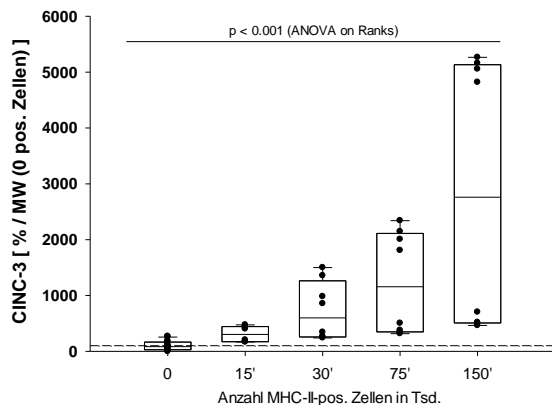
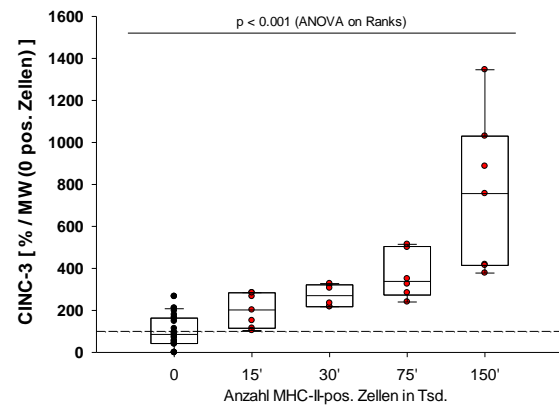


Abbildung 6: **Chemokin CINC-2 in den Zellkulturüberständen** von Kokulturen bestehend aus je 150.000 (150') MHC-II-neg. Zellen aus Nebennieren von Kontrolltieren kultiviert mit verschiedenen Zellzahlen (Abszisse) MHC-II-pos. Zellen aus Nebennieren von A) Kontrolltieren, B) Tieren mit CIA am Tag 5 nach Immunisierung, C) Tieren mit CIA am Tag 28 nach Immunisierung und D) Tieren mit CIA am Tag 40 nach Immunisierung. Die Signifikanztestung wurde mit ANOVA on Ranks durchgeführt. Abkürzungen: MW, Mittelwert; 0 pos. Zellen, 0 MHC-II-pos. Zellen in der Kokultur.

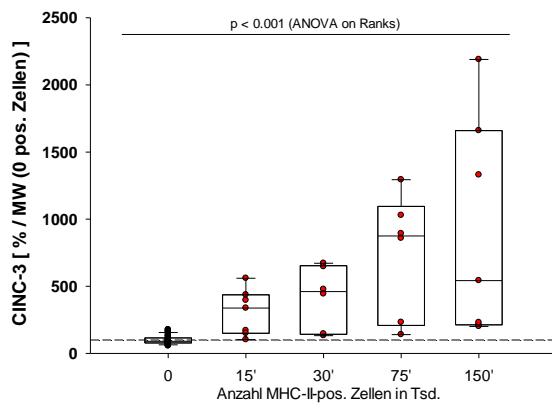
A)



B)



C)



D)

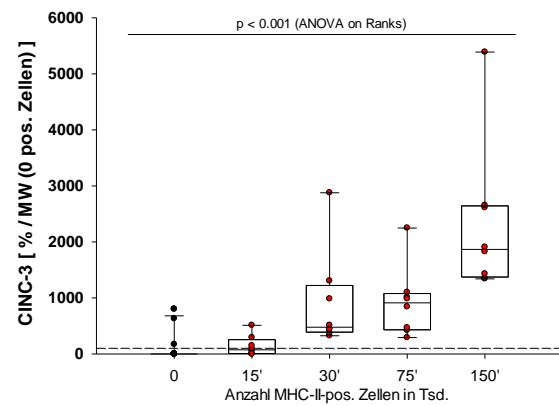


Abbildung 7: **Chemokin CINC-3 in den Zellkulturüberständen** von Kokulturen bestehend aus je 150.000 (150') MHC-II-neg. Zellen aus Nebennieren von Kontrolltieren kultiviert mit verschiedenen Zellzahlen (Abszisse) MHC-II-pos. Zellen aus Nebennieren von A) Kontrolltieren, B) Tieren mit CIA am Tag 5 nach Immunisierung, C) Tieren mit CIA am Tag 28 nach Immunisierung und D) Tieren mit CIA am Tag 40 nach Immunisierung. Die Signifikanztestung wurde mit ANOVA on Ranks durchgeführt. Abkürzungen: MW, Mittelwert; 0 pos. Zellen, 0 MHC-II-pos. Zellen in der Kokultur.

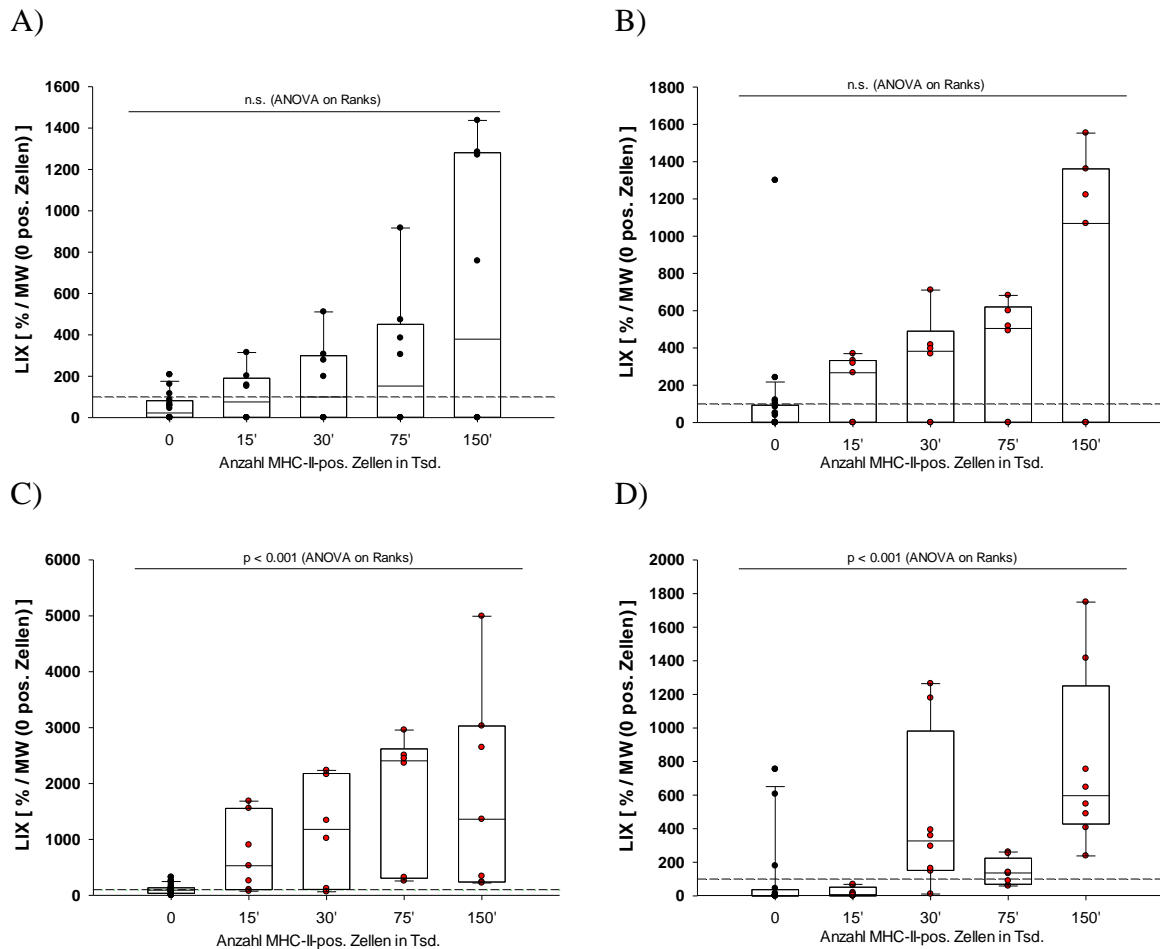


Abbildung 8: **Chemokin LIX in den Zellkulturüberständen** von Kokulturen bestehend aus je 150.000 (150⁺) MHC-II-neg. Zellen aus Nebennieren von Kontrolltieren kultiviert mit verschiedenen Zellzahlen (Abszisse) MHC-II-pos. Zellen aus Nebennieren von A) Kontrolltieren, B) Tieren mit CIA am Tag 5 nach Immunisierung, C) Tieren mit CIA am Tag 28 nach Immunisierung und D) Tieren mit CIA am Tag 40 nach Immunisierung. Die Signifikanztestung wurde mit ANOVA on Ranks durchgeführt. Abkürzungen: MW, Mittelwert; 0 pos. Zellen, 0 MHC-II-pos. Zellen in der Kokultur; n.s., nicht signifikant.

In weiterführenden Versuchen innerhalb der AG Straub fiel außerdem ein moderater stimulierender Einfluss von CINC-2 auf die Glukokortikoidproduktion von unseparierten Nebennierenzellen zum Arthritiszeitpunkt Tag 25 – 28 auf, während alle anderen Chemokine hier keinen Effekt zeigten (Daten nicht abgebildet). Bei demselben Versuchsaufbau wie bei den in Abb. 5 - 8 gezeigten Ergebnissen, lediglich mit unseparierten Nebennierenzellen anstelle von MHC-II-negativen Zellen in Kokultur mit MHC-II-pos. Zellen, ergaben sich keine wesentlich anderen Ergebnisse (Abb. 9).

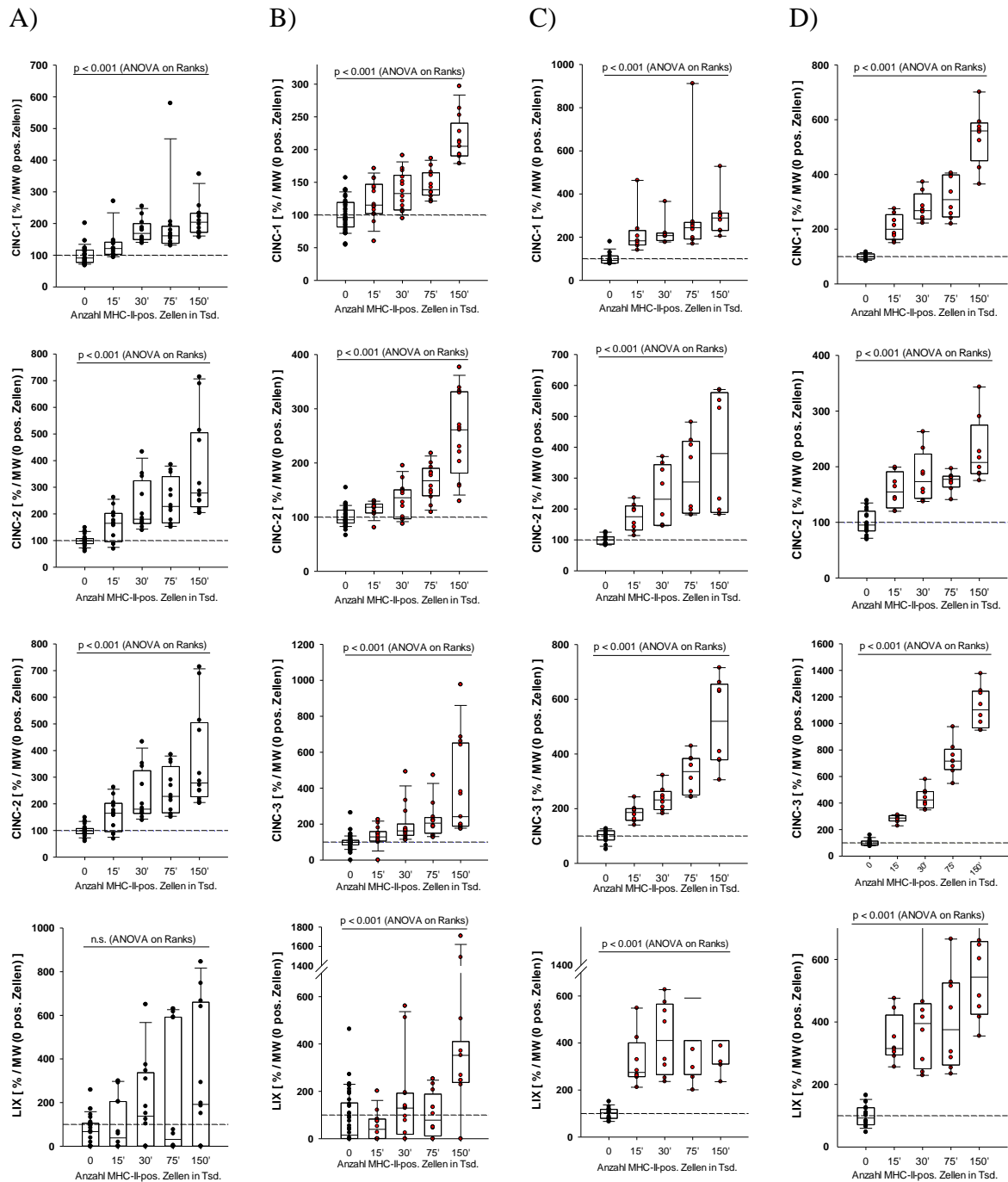


Abbildung 9: Chemokine CINC 1-3 und LIX in den Zellkulturüberständen von Kokulturen bestehend aus je 150.000 (150') unseparierten Nebennierenzellen aus Kontrolltieren kultiviert mit verschiedenen Zellzahlen (Abszisse) MHC-II-pos. Zellen aus Nebennieren von A) Kontrolltieren, B) Tieren mit CIA am Tag 5 nach Immunisierung, C) Tieren mit CIA am Tag 28 nach Immunisierung und D) Tieren mit CIA am Tag 40 nach Immunisierung. Die Signifikanztestung wurde mit ANOVA on Ranks durchgeführt. Abkürzungen: MW, Mittelwert; 0 pos. Zellen, 0 MHC-II-pos. Zellen in der Kokultur; n.s., nicht signifikant

4.3. Quantität von IL-1 β in Kokulturen aus adrenalen Zellen

Die Messungen von IL-1 β in den Kokulturen sind zu Zwecken der Vollständigkeit dargestellt, allerdings befinden sich die meisten Messwerte im Bereich des Detektionslimits, sodass sich keine Aussage hierzu treffen lässt (Abb. 10). Weitere Untersuchungen der AG Straub ergaben allerdings, dass IL-1 β eine wesentliche Rolle im Zusammenspiel von CIA und Glukokortikoiden einnimmt. So zeigte zum Beispiel ein Zellkulturmodellversuch, dass IL-1 β die Glukokortikoidproduktion hemmt (25).

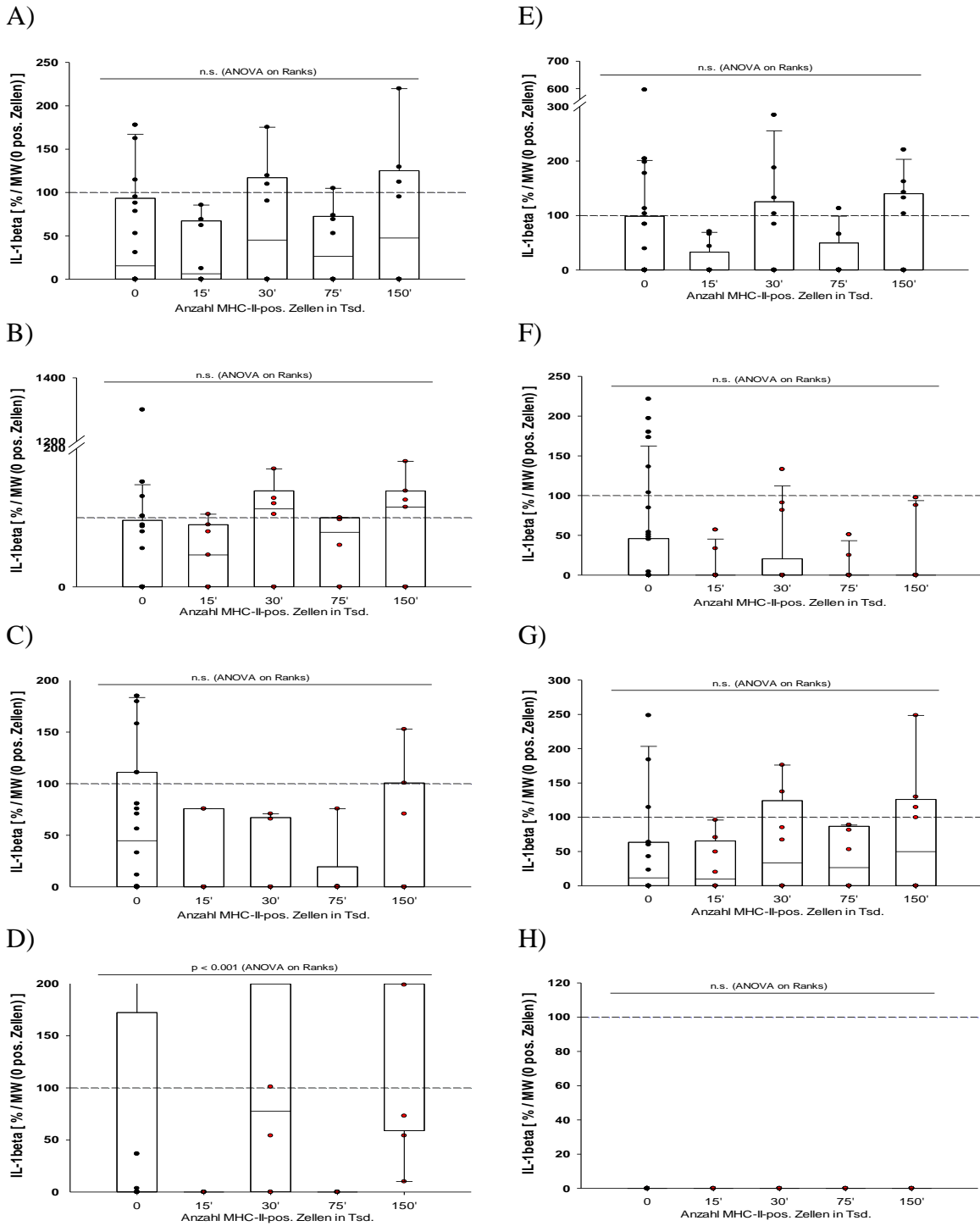


Abbildung 10: Zytokin Interleukin 1 beta (IL-1 β) in den Zellkulturüberständen von Kokulturen bestehend aus je 150.000 (150') MHC-II-neg. Zellen (A-D) bzw. 150.000 (150') unseparierten Zellen (E-H) aus Nebennieren von Kontrolltieren kultiviert mit verschiedenen Zellzahlen (Abszisse) MHC-II-pos. Zellen aus Nebennieren von A/E Kontrolltieren, B/F) Tieren mit CIA am Tag 5 nach Immunisierung, C/G) Tieren mit CIA am Tag 28 nach Immunisierung und D/H) Tieren mit CIA am Tag 40 nach Immunisierung. Die Signifikanztestung wurde mit ANOVA on Ranks durchgeführt. Abkürzungen: MW, Mittelwert; 0 pos. Zellen, 0 MHC-II-pos. Zellen in der Kokultur; n.s., nicht signifikant.

4.4. Neutrophile Granulozyten in Nebennieren

Die gemessenen Chemokine CINC 1-3 und LIX sind Chemoattraktantien für neutrophile Granulozyten (31–33). Bei der immunhistologischen Untersuchung von Nebennieren, sowohl aus Kontrolltieren als auch aus arthritischen Tieren, konnten jedoch nur sehr wenige bis keine neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Abb. 11 und 12). Dies widerspricht einer Chemotaxis dieser Leukozyten unter Kontroll- und arthritischen Bedingungen in die Nebenniere.

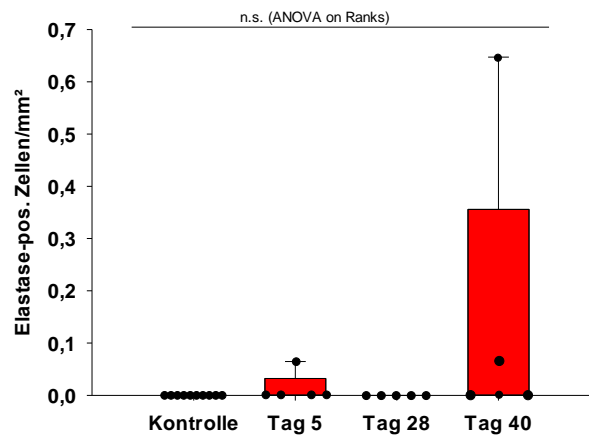


Abbildung 11: **Neutrophile Granulozyten in Nebennieren** von Kontrolltieren und von arthritischen Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten der CIA. Ein Punkt repräsentiert die durchschnittliche Zelldichte von neutrophilen Granulozyten in einer Nebenniere einer Ratte.

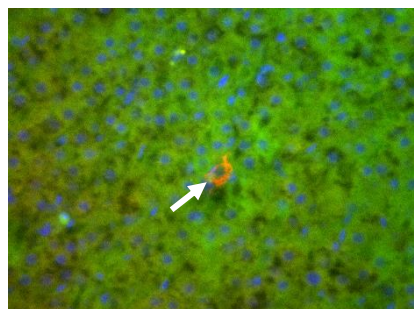


Abbildung 12: **Elastase-positive Zelle/Neutrophiler Granulozyt** in der Nebenniere einer Ratte mit CIA am Tag 40 nach Immunisierung.

4.5. Migrationsverhalten von KMDCs und dem Einfluss von CIA

Neben ihrer Wirkung auf neutrophile Granulozyten fungieren die Chemokine CINC 1-3 und LIX auch als Lockstoffe für Makrophagen ($M\Phi$) und DCs (34). Um das Migrationsverhalten der MHC-II-pos. Zellen ($M\Phi/DCs$) zu untersuchen, wurden je 10×10^6 PKH-26-gefärbte KMDCs Kontrolltieren über die basale Schwanzvene in das Gefäßsystem appliziert. Eine Stunde später konnten davon nur sehr vereinzelt Zellen in den Nebennieren, Lymphknoten und Milzen der Tiere gefunden werden, wobei hiervon der Großteil der Zellen in der Milz zu finden waren. Diese Ergebnisse unterschieden sich außerdem nicht bei Generierung der DCs aus Kontroll- oder arthritischen Tieren (Abb. 13 und 14). Dies spricht gegen eine durch Chemokine induzierte aktive Migration von Makrophagen und dendritischen Zellen in die Nebenniere.

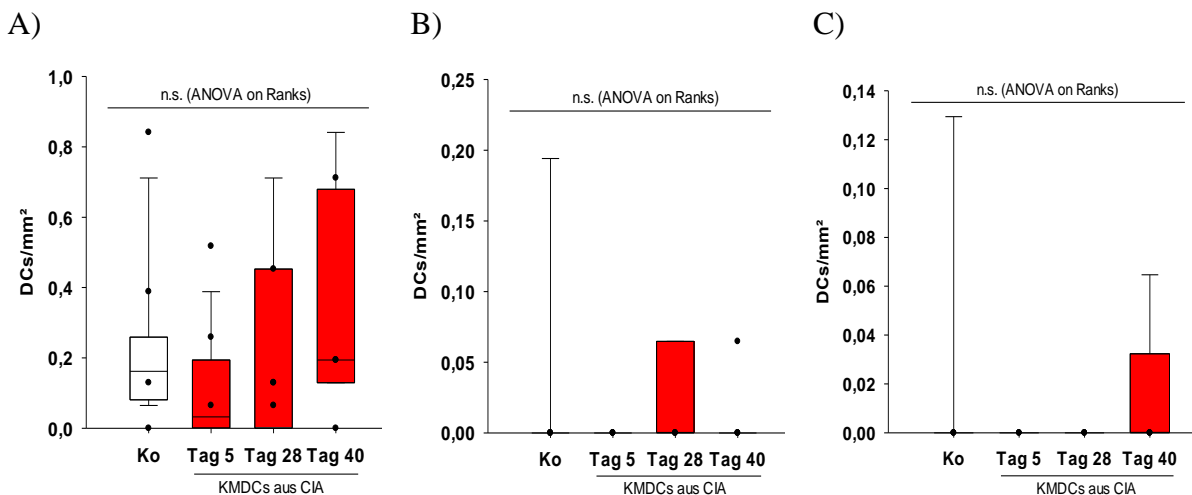


Abbildung 13: **Zellichte von applizierten PKH-26-gefärbten KMDCs** in A) Milzen, B) Lymphknoten und C) Nebennieren von Kontrolltieren. Die Abszisse beschreibt das (arthritische) Stadium zum Zeitpunkt der Entnahme von Knochenmarksstammzellen. Die Applikation erfolgte ausschließlich in Kontrolltieren. Abkürzungen: KMDCs, aus Knochenmarksstammzellen generierte dendritische Zellen; DCs, dendritische Zellen; Ko, Kontrolle (KMDCs aus dem Knochenmark nicht immunisierter Tiere); CIA, Kollagen-induzierte Arthritis; n.s., nicht signifikant.

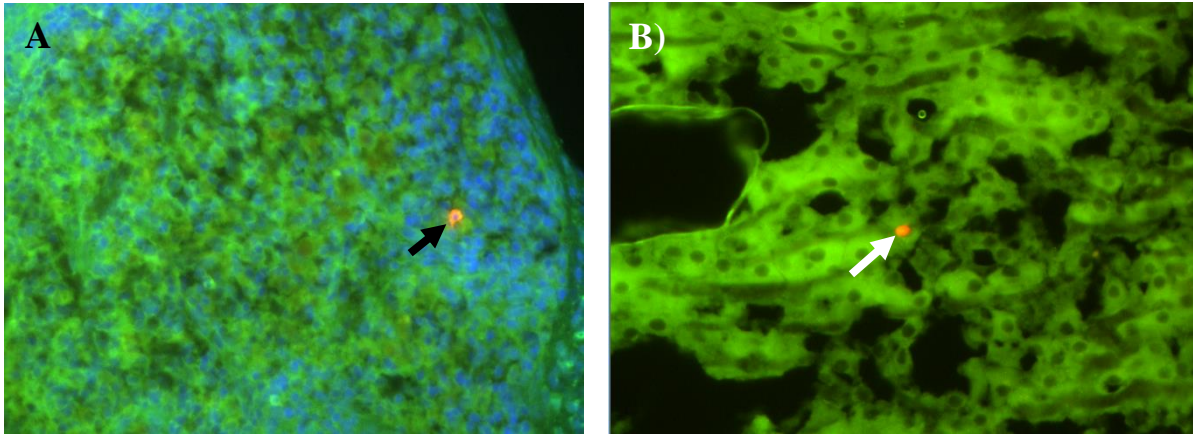


Abbildung 14: **Applizierte PKH-26-gefärbte KMDCs** in den Organen eines Kontrolltieres. A) Milz, B) Nebenniere. Abkürzungen: KMDCs, aus Knochenmark generierte dendritische Zellen.

5. Diskussion

5.1. Einfluss intraadrenaler MHC-II-pos. Zellen auf die Glukokortikoidproduktion

Laut unseren Ergebnissen haben MHC-II-pos. Zellen eine hemmende Wirkung auf die Glukokortikoidausschüttung (Abb. 3, 4). Auch andere Arbeitsgruppen haben einen Einfluss der MHC-II-Zellen auf die Sekretion von Glukokortikoiden entdeckt. Beispielsweise wurde auch bei experimenteller Colitis eine Immunzell-Nebennierenrinden-Interaktion festgestellt, wobei die intraadrenalen Lymphozyten und erhöhten IL-6-Werte hierbei jedoch zu einer Stimulation der Glukokortikoidproduktion führten (35). Eine Möglichkeit wäre, dass die Dauer, der über den Normwert hinaus erhöhten Zytokine und vermehrten intraadrenalen MHC-II-pos. Zellen darüber entscheidet, ob die Glukokortikoid-Reaktion adäquat ist oder nicht. Dafür spricht auch, dass andere Studien oft nur akute Entzündungen in ihre Untersuchungen miteinbezogen und die chronische Komponente vernachlässigt blieb (35,36). Dagegen spricht allerdings, dass die Glukokortikoidwerte bei rheumatoider Arthritis schon sehr früh nur normal hoch, also relativ zum Zytokinlevel zu gering sind (37). Auch bei der chronischen Arthritis im Tiermodell tritt die inadäquate Glukokortikoidsekretion bereits relativ früh, nämlich ab Tag 5 nach Induktion der experimentellen Arthritis an der Ratte und vor klinischer Manifestation der Erkrankung, auf (14). Denkbar ist daher auch eine ambivalente Wirkung der Immunzellen auf die Glukokortikoidproduktion. Dies wird unterstützt von der Tatsache, dass in Kokulturen aus MHC-II-neg. Nebennierenzellen aus Kontrolltieren und MHC-II-pos. Zellen aus Nebennieren von Tieren mit CIA am Tag 28 keine Hemmung der Glukokortikoide zu verzeichnen war (Abb. 3).

5.2. Die Rolle der Chemokine im Kontext der relativen Nebenniereninsuffizienz

Eine alternative Erklärung für die fehlende Hemmung der Glukokortikoidproduktion am Tag 28 bei CIA ist ein potenziell stimulierender Effekt von CINC-2 auf die Glukokortikoidsekretion, welcher den hemmenden Einfluss der anderen Faktoren (siehe 5.1.) kompensieren könnte. CINC-2 zeigte nämlich nicht nur besonders hohe Konzentrationen, sondern diese auch betont am Tag 28 nach Immunisierung (Abb. 6B). Zusätzlich scheint nach weiteren Versuchen der AG Straub CINC-2 eine direkte stimulierende Komponente auf die Glukokortikoidproduktion zu besitzen (25).

Insgesamt waren in weiterführenden Untersuchungen der AG Straub die durch IL-1 β stimulierten CXC Chemokine CINC-1, -2 und -3 sowie LIX unter arthritischen Bedingungen

in höheren Konzentrationen zu messen als unter Kontrollbedingungen. Die damit einhergehende positive Korrelation von intraadrenalen MHC-II-pos. Zellen und Chemokinen im Verlauf der Arthritis könnte darauf hindeuten, dass die MHC-II-pos. Zellen die Quelle der Chemokine sind. Unterstützend können Chemokine von Makrophagen, welche der Gruppe der MHC-II-pos. Zellen angehören, sezerniert werden (38). Zusätzlich exprimieren Monozyten und Makrophagen auf ihrer Oberfläche den zu den Chemokinen korrespondierenden Rezeptor (39) und werden unter anderem in der Leber durch diese auch angezogen (40). Zusammengefasst scheint unter CIA eine parakrine und autokrine Verstärkungsreaktion, bei der Chemokine und Zytokine MHC-II-pos. Zellen zur Migration in die Nebenniere und auch zur Produktion weiterer Chemo- und Zytokine anregen, stattzufinden.

5.3. IL-1 β im Zusammenspiel mit Chemokinen und der Glukokortikoidproduktion

Obwohl bei den Nebennierenzellkulturen IL-1 β kaum zu messen war, ergaben weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe deutlich erhöhte Plasmawerte dieses Zytokins bei Tieren mit CIA im Vergleich zu Kontrolltieren. Während andere Gruppen, erneut eher an akuten Entzündungsgeschehen orientiert, bereits klar eine Stimulation der Glukokortikoidproduktion durch IL-1 β beschreiben (16,41), zeigten die Experimente der AG Straub eine Hemmung der Glukokortikoidausschüttung durch IL-1 β (nicht dargestellte Vorergebnisse). Zusätzlich scheint die Chemokinsekretion durch IL-1 β stimuliert zu werden (ebenfalls nicht dargestellte Vorergebnisse). Schließlich lässt sich feststellen, dass IL-1 β ein zentrales Zytokin im Zusammenspiel von CIA und den krankheitsrelevanten Glukokortikoiden ist, dessen genaue Wirkungsweisen und Funktion in Zukunft noch näher untersucht werden sollten.

5.4. Migrationsverhalten von KMDCs unter dem Einfluss von CIA

Es konnte keine Migration von Makrophagen und dendritischen Zellen in die Nebenniere nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund ist, dass die Immunzellen schon von Beginn an in den Nebennieren vorhanden sind und unter CIA lediglich einer morphologischen Veränderung und/oder einer durch IL-1 β /IL-6 bedingten Rezeptor-Aufregulation unterliegen. Dies würde zu einer nur scheinbaren höheren Zelldichte an MHC-II-pos. Zellen im Verlauf der CIA führen und erklären warum eine Migration nicht nachweislich ist. Es ist allerdings auch möglich, dass Fehler im Versuchsaufbau zum fehlenden Nachweis geführt haben. Beispielsweise könnte die Fluoreszenzfärbung dem Applikations- und Präparationsprozess

nicht lange genug standgehalten haben, sodass sie zum Zeitpunkt der Mikroskopie daher nicht mehr sichtbar war. Auch eine zu kurze Inkubationszeit zwischen Applikation der Zellen und Tötung der Tiere ist grundsätzlich möglich, obwohl dieser Fehler bei der Methodenetablierung weitgehend ausgeschlossen wurde.

5.5. Neutrophile Granulozyten in Nebennieren von Ratten mit CIA

Die unter 5.2. diskutierten Chemokine fungieren auch als Lockstoffe für neutrophile Granulozyten (31–33). Die Möglichkeit einer Migration dieser Leukozyten in die Nebenniere wurde in der Vergangenheit bereits nachgewiesen (42,43). Auch eine positive Korrelation von einer Infiltration der Nebenniere durch neutrophile Granulozyten und erhöhten Chemokinspiegeln wurde bereits gezeigt (43). Deshalb wäre auch in unseren Versuchen eine Migration ähnlich wie bei den MHC-II-positiven Zellen zu erwarten gewesen. Dennoch konnten im Rahmen dieser Arbeit kaum neutrophile Granulozyten in den Nebennieren, weder von Kontrolltieren noch von arthritischen Ratten, nachgewiesen werden (Abb. 11 und 12). Mögliche Gründe für das Fehlen von neutrophilen Granulozyten in den Nebennieren könnten Fehler im Versuchsaufbau gewesen sein. Zum Beispiel ist eine inadäquate Färbung aufgrund der relativ geringen Auswahl an Ratten-spezifischen Materialien denkbar.

5.6. Klassifizierung von Mitochondrienschäden

In vorangegangenen Experimenten der AG Straub wurden in Nebennieren aus arthritischen Ratten Veränderungen an Mitochondrien beobachtet (14). Um diese Veränderungen näher zu klassifizieren wurden Fluoreszenzfärbungen in verschiedenen Variationen von histologischen Gefrierschnitten aus Nebennieren angefertigt. Die Fluoreszenzspektren der verwendeten Farbstoffe (siehe Methoden) lagen jedoch sowohl für eine Auswertung mittels Durchflusszytometrie, als auch mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops nicht weit genug voneinander entfernt. Außerdem wiesen die Nebennierenzellen eine starke Autofluoreszenz im Spektrum für den grünen Farbstoff auf, was die Auswertung zusätzlich erschwerte. Darüber hinaus war die Färbung mit dem grünen Farbstoff nicht ausreichend reproduzierbar. Diese Umstände führten zu einem Ablassen vom Versuch, die mitochondrialen Veränderungen in Nebennieren von arthritischen Ratten näher zu klassifizieren, sodass die Fragestellung für zukünftige Untersuchungen offen bleibt.

5.7. Probleme und Limitationen

Die Übertragung der Ergebnisse auf rheumatoide Arthritis beim Menschen ist aufgrund der ethisch notwendigen Anwendung eines Tiermodells (CIA) nur begrenzt möglich. Eine Begrenzung stellte außerdem die geringe Zellzahl dar, welche aus einer Nebenniere gewonnen werden konnte (ca. 0,4 Mio. Zellen). Die Nebennierenzellen waren in Kultur sehr empfindlich, wenig adhären und reagierten in gleichartigen Wiederholungsversuchen sehr variabel. Zusätzlich ist Kortikosteron auch ein Stresshormon, dessen natürliche Fluktuationen nur schwer zu standardisieren sind. Aus diesen Gründen wurden zu Gunsten der Vergleichbarkeit sämtliche Daten in Prozent, relativ zum Mittelwert der jeweiligen Kontrolle, angegeben.

6. Zusammenfassung

Bei rheumatoider und experimenteller Arthritis verhält sich die Glukokortikoidsekretion relativ zum zytokinwirksamen Entzündungsmaß nicht adäquat. Insbesondere die Zytokine IL-1 β und IL-6 sowie die CXC-Chemokine CINC 1 – 3 und LIX scheinen dabei von Relevanz zu sein. Zusätzlich kommen MHC-II-Rezeptor-positive Zellen mit Fortschreiten der Arthritis vermehrt und insbesondere auch innerhalb der Nebenniere vor.

Der Zusammenhang dieser intraadrenalen Immunzellen, dem betonten Auftreten der Chemokine und der inadäquaten Glukokortikoidproduktion unter arthritischen Bedingungen wurde in dieser Arbeit tiefergehend untersucht. Hierzu wurde ein Rattenmodell mit Kollagen-induzierter chronischer Arthritis (CIA) und verschiedene, zum Teil kombinierte Zellkulturen durchgeführt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass intraadrenale MHC-II-pos. Zellen in experimenteller chronischer Arthritis die Glukokortikoidausschüttung hemmen. Unter bestimmten, noch nicht ausreichend untersuchten Bedingungen ist jedoch eine Umkehr des Mechanismus bis hin zu einer Stimulation der Glukokortikoidproduktion durch die Immunzellen denkbar. Die CXC Chemokine CINC 1, 2 und 3 sowie LIX nehmen im Verlauf der Arthritis in ihrer Konzentration zu und spielen bei der Regulation der Glukokortikoidsekretion in CIA vermutlich eine Rolle. Eine Anlockung von neutrophilen Granulozyten bewirken sie jedoch nicht. Ebenso scheint keine aktive Migration von MHC-II-pos. Zellen in die Nebennieren stattzufinden.

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Übersicht über die Versuchsbedingungen zu den Kokulturen aus MHC-II-Rezeptorpositiven und -negativen Nebennierenzellen..... | 21 |
| Tabelle 2: Zellkammer-Schema der Kokulturen..... | 23 |

Abbildungsverzeichnis

Sämtliche Abbildungen v. Krammetsvogel.

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schemazeichnung eines Zellkultureinsatzes in einer Zellkammer einer 24-well-Platte..... | 22 |
| Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf der Kokulturen aus MHC-II-positiven und -negativen Zellen..... | 23 |
| Abbildung 3: Gemessenes Kortikosteron in Zellkulturüberständen aus verschiedenen Kokulturen mit MHC-II-negativen und -positiven Nebennierenzellen aus Tieren mit und ohne CIA in Relation zum Kortikosteron von äquivalenter Mengen MHC-II-negativer Nebennierenzellen aus Kontrolltieren..... | 30 |
| Abbildung 4: Gemessenes Kortikosteron in Zellkulturüberständen aus verschiedenen Kokulturen mit unseparierter und MHC-II-positiven Nebennierenzellen aus Tieren mit und ohne CIA in Relation zum Kortikosteron von äquivalenter Mengen unseparierter Nebennierenzellen aus Kontrolltieren..... | 31 |
| Abbildung 5: Chemokin CINC-1 in den Zellkulturüberständen von Kokulturen bestehend aus je 150.000 MHC-II-neg. Zellen aus Nebennieren von Kontrolltieren kultiviert mit verschiedenen Zellzahlen MHC-II-pos. Zellen aus Nebennieren von Kontrolltieren und Tieren mit CIA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung..... | 32 |
| Abbildung 6: Chemokin CINC-2 in den Zellkulturüberständen von Kokulturen bestehend aus je 150.000 MHC-II-neg. Zellen aus Nebennieren von Kontrolltieren kultiviert mit verschiedenen Zellzahlen MHC-II-pos. Zellen aus Nebennieren von Kontrolltieren und Tieren mit CIA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung..... | 33 |
| Abbildung 7: Chemokin CINC-3 in den Zellkulturüberständen von Kokulturen bestehend aus je 150.000 MHC-II-neg. Zellen aus Nebennieren von Kontrolltieren kultiviert mit verschiedenen Zellzahlen MHC-II-pos. Zellen aus Nebennieren von Kontrolltieren und Tieren mit CIA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung..... | 34 |
| Abbildung 8: Chemokin LIX in den Zellkulturüberständen von Kokulturen bestehend aus je 150.000 MHC-II-neg. Zellen aus Nebennieren von Kontrolltieren kultiviert mit verschiedenen Zellzahlen MHC-II-pos. Zellen aus Nebennieren von Kontrolltieren und Tieren mit CIA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung..... | 35 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 9: Chemokine CINC 1-3 und LIX in den Zellkulturüberständen von Kokulturen bestehend aus je 150.000 unseparierten Nebennierenzellen aus Kontrolltieren kultiviert mit verschiedenen Zellzahlen MHC-II-pos. Zellen aus Nebennieren von Kontrolltieren und Tieren mit CIA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung..... | 36 |
| Abbildung 10: Zytokin Interleukin 1 beta (IL-1 β) in den Zellkulturüberständen von Kokulturen bestehend aus je 150.000 MHC-II-neg. Zellen (A-D) bzw. 150.000 unseparierten Zellen (E-H) aus Nebennieren von Kontrolltieren kultiviert mit verschiedenen Zellzahlen MHC-II-pos. Zellen aus Nebennieren von Kontrolltieren und Tieren mit CIA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung..... | 38 |
| Abbildung 11: Anzahl Neutrophiler Granulozyten in Nebennieren von Kontrolltieren und von arthritischen Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten der CIA..... | 39 |
| Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Neutrophilen Granulozyten in der Nebenniere einer Ratte mit CIA am Tag 40 nach Immunisierung..... | 39 |
| Abbildung 13: Zelldichte von applizierten PKH-26-gefärbten KMDCs in Milzen, Lymphknoten und Nebennieren von Kontrolltieren..... | 40 |
| Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PKH-26-gefärbten KMDCs in einer Milz (A) bzw. Nebenniere (B) eines Kontrolltieres..... | 41 |

Literaturverzeichnis

1. Symmons DPM. Epidemiology of rheumatoid arthritis: Determinants of onset, persistence and outcome. *Best practice & research. Clinical rheumatology* 2002;16(5):707–22.
2. Imboden JB. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annual review of pathology* 2009;4:417–34.
3. Visser H. Early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Best practice & research. Clinical rheumatology* 2005;19(1):55–72.
4. Tarner IH, Harle P, Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. The different stages of synovitis: Acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. *Best practice & research. Clinical rheumatology* 2005;19(1):19–35.
5. Straub RH, Wahle M., Baerwald C. G. Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis unter Betrachtung von neuroendokrino-immunen Interaktionen. In: Straub RH, editor. *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen*: Vadenhoeck & Ruprecht; 2007. p. 80–88.
6. Caplan L, Wolfe F, Russell AS, Michaud K. Corticosteroid use in rheumatoid arthritis: Prevalence, predictors, correlates, and outcomes. *The Journal of rheumatology* 2007;34(4):696–705.
7. Saldanha C, Tougas G, Grace E. Evidence for anti-inflammatory effect of normal circulating plasma cortisol. *Clinical and experimental rheumatology* 1986;4(4):365–66.
8. Schneider M, Lelgemann M, Abholz HH, Blumenroth M, Flügge C, Gerken M, Jäniche H, Kunz R, Krüger K, Mau W, Specker C, Zellner M. Management der frühen rheumatoiden Arthritis: Interdisziplinäre Leitlinie. URL: www.dgrh.de/leitlinien.html.
9. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *The New England journal of medicine* 1995;332(20):1351–62.
10. Petrescu AD, Kain J, Liere V, Heavener T, DeMorrow S. Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Dysfunction in Cholestatic Liver Disease. *Frontiers in endocrinology* 2018;9:660.
11. Straub RH, Bijlsma JWJ, Masi A, Cutolo M. Role of neuroendocrine and neuroimmune mechanisms in chronic inflammatory rheumatic diseases--the 10-year update. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2013;43(3):392–404.
12. Jessop DS, Harbuz MS. A defect in cortisol production in rheumatoid arthritis: Why are we still looking? *Rheumatology (Oxford, England)* 2005;44(9):1097–100.
13. Straub RH, Buttgerit F, Cutolo M. Alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in systemic immune diseases - a role for misguided energy regulation. *Clinical and experimental rheumatology* 2011;29(5 Suppl 68):23-31.
14. Wolff C, Krinner K, Schroeder JA, Straub RH. Inadequate corticosterone levels relative to arthritic inflammation are accompanied by altered mitochondria/cholesterol breakdown in adrenal cortex: a steroid-inhibiting role of IL-1beta in rats. *Annals of the rheumatic diseases* 2015;74(10):1890–97.
15. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocrine reviews* 1998;19(2):101–43.
16. Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis. *Molecular and cellular endocrinology* 2004;215(1-2):135–41.

17. Johnson-Huang LM, McNutt NS, Krueger JG, Lowes MA. Cytokine-producing dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory skin diseases. *Journal of clinical immunology* 2009;29(3):247–56.
18. Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1993;77(6):1690–94.
19. Späth-Schwalbe E, Born J, Schrezenmeier H, Bornstein SR, Stromeyer P, Drechsler S, et al. Interleukin-6 stimulates the hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis in man. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1994;79(4):1212–14.
20. Gisslinger H, Svoboda T, Clodi M, Gilly B, Ludwig H, Havelec L, et al. Interferon-alpha stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in vivo and in vitro. *Neuroendocrinology* 1993;57(3):489–95.
21. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS journal* 2018;285(16):2944–71.
22. Nishimura M, Kuboi Y, Muramoto K, Kawano T, Imai T. Chemokines as novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009;1173:350–56.
23. Sato T. Class II MHC-expressing cells in the rat adrenal gland defined by monoclonal antibodies. *Histochemistry and cell biology* 1998;109(4):359–67.
24. Renner U, Sapochnik M, Lucia K, Stalla GK, Arzt E. Intrahypophyseal Immune-Endocrine Interactions: Endocrine Integration of the Inflammatory Inputs. *Frontiers of hormone research* 2017;48:37–47.
25. Stangl H, Krammetsvoigl A, Lesiak M, Wolff C, Straub RH. MHC/class-II-positive cells inhibit corticosterone of adrenal gland cells in experimental arthritis: a role for IL-1 β , IL-18, and the inflammasome. *Sci Rep.* 2020 Oct 13;10(1):17071.
26. del Rey A, Wolff C, Wildmann J, Randolph A, Hahnel A, Besedovsky HO, et al. Disrupted brain-immune system-joint communication during experimental arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2008;58(10):3090–99.
27. Kamada H, Goto M, Matsuura S, Takaoka Y, Nagai H. Immunopharmacological studies on collagen-induced arthritis in dark Agouti (DA) rats. *Japanese journal of pharmacology* 1997;74(4):313–22.
28. Dimitrijević M, Arsenović-Ranin N, Bufan B, Nacka-Aleksić M, Macanović ML, Milovanović P, et al. Collagen-induced arthritis in Dark Agouti rats as a model for study of immunological sexual dimorphisms in the human disease. *Experimental and molecular pathology* 2018;105(1):10–22.
29. Conley AJ, Bird IM. The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biology of reproduction* 1997;56(4):789–99.
30. Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *European journal of immunology* 1997;27(2):431–41.
31. Madorin WS, Rui T, Sugimoto N, Handa O, Cepinskas G, Kvietys PR. Cardiac myocytes activated by septic plasma promote neutrophil transendothelial migration: Role of platelet-activating factor and the chemokines LIX and KC. *Circulation research* 2004;94(7):944–51.

32. Takano K, Nakagawa H. Contribution of cytokine-induced neutrophil chemoattractant CINC-2 and CINC-3 to neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. *Inflammation research official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 2001;50(10):503–08.
33. Shibata F, Konishi K, Nakagawa H. Identification of a common receptor for three types of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs). *Cytokine* 2000;12(9):1368–73.
34. Marsh DR, Flemming JMP. Inhibition of CXCR1 and CXCR2 chemokine receptors attenuates acute inflammation, preserves gray matter and diminishes autonomic dysreflexia after spinal cord injury. *Spinal cord* 2011;49(3):337–44.
35. Franchimont D, Bouma G, Galon J, Wolkersdörfer GW, Haidan A, Chrousos GP, et al. Adrenal cortical activation in murine colitis. *Gastroenterology* 2000;119(6):1560–68.
36. Engström L, Rosén K, Angel A, Fyrberg A, Mackerlova L, Kongsman JP, et al. Systemic immune challenge activates an intrinsically regulated local inflammatory circuit in the adrenal gland. *Endocrinology* 2008;149(4):1436–50.
37. Kanik KS, Chrousos GP, Schumacher HR, Crane ML, Yarboro CH, Wilder RL. Adrenocorticotropin, glucocorticoid, and androgen secretion in patients with new onset synovitis/rheumatoid arthritis: Relations with indices of inflammation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2000;85(4):1461–66.
38. Shibata F, Shibata Y, Yoshimoto Y, Nakagawa H. The expression of three types of CINCs by lipopolysaccharide-stimulated rat macrophages is inhibited similarly by anti-inflammatory steroids. *Inflammation research official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 2000;49(2):80–85.
39. Bonecchi R, Facchetti F, Dusi S, Luini W, Lissandrini D, Simmelink M, et al. Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 2000;164(7):3862–69.
40. Amanzada A, Moriconi F, Mansuroglu T, Cameron S, Ramadori G, Malik IA. Induction of chemokines and cytokines before neutrophils and macrophage recruitment in different regions of rat liver after TAA administration. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2014;94(2):235–47.
41. Tkachenko IV, Jääskeläinen T, Jääskeläinen J, Palvimo JJ, Voutilainen R. Interleukins 1 α and 1 β as regulators of steroidogenesis in human NCI-H295R adrenocortical cells. *Steroids* 2011;76(10-11):1103–15.
42. Butler LD, Layman NK, Cain RL, Riedl PE, Mohler KM, Bobbitt JL, et al. Interleukin 1-induced pathophysiology: Induction of cytokines, development of histopathologic changes, and immunopharmacologic intervention. *Clinical immunology and immunopathology* 1989;53(3):400–21.
43. Kanczkowski W, Chatzigeorgiou A, Grossklaus S, Sprott D, Bornstein SR, Chavakis T. Role of the endothelial-derived endogenous anti-inflammatory factor Del-1 in inflammation-mediated adrenal gland dysfunction. *Endocrinology* 2013;154(3):1181–89.

Eidesstattliche Erklärung

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

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

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Die vorgelegten Druckexemplare sind identisch mit der elektronischen Version der Arbeit.

Ort, Datum

Anita Krammetsvogl

Danksagung

In erster Linie danke ich Herrn Prof. Dr. Rainer H. Straub für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, die Überlassung dieser interessanten Fragestellung und die perfekte Betreuung zum eigenständigen Arbeiten.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Hubert Stangl, der stets ein offenes Ohr für alle Labormitglieder hatte und mich hilfsbereit während des praktischen Teils meiner Arbeit unterstützte.

Außerdem danke ich Frau Angelika Gräber für das Teilen ihrer unersetzbaren Erfahrung im Tier- und Zelllabor und ihre großzügige Unterstützung bei der praktischen Durchführung.

Weiterhin möchte ich Herrn Engelbert Meier und seinem gesamten Team im Tierlabor für die sorgsame Versorgung der Tiere und allzeit beratende Unterstützung danken.

Nicht zuletzt bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, die mir diesen Werdegang überhaupt ermöglicht haben.

Vielen Dank!