

**Histologische Untersuchung der rheumatoiden
Gelenkveränderungen bei der muskarinischen
Acetylcholinrezeptor-Subtyp-M3-Knockout-Maus im
experimentellen Modell der Antikörper-induzierten
rheumatoiden Arthritis**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Dittmann, Nicole
aus Neuhaus am Rennweg

Gießen 2018

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie,
Labor für experimentelle Unfallchirurgie,
unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Christian Heiß,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Katrin Susanne Lips
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Tag der Disputation: 08.05.2019

1	Einleitung	1
1.1	Klinisches Bild der rheumatoiden Arthritis (RA)	1
1.2	Das non-neuronale cholinerge System (NNCS)	3
1.3	Aufbau eines Gelenks	11
2	Fragestellung	17
3	Material und Methoden.....	18
3.1	Material	18
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	18
3.1.2	Kits.....	20
3.1.3	Antikörper.....	20
3.2	Tiermodell	20
3.2.1	Genotypisierung.....	21
3.2.2	Versuchsablauf und Probengewinnung	23
3.3	Histologische Standardfärbungen.....	27
3.3.1	HE-Färbung	27
3.3.2	Alcianblau-PAS-Hämatoxylin-Färbung	28
3.3.3	Toluidinblau-Färbung	28
3.4	Enzymnachweis	28
3.4.1	Alkalische Phosphatase (ALP)	28
3.4.2	Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP).....	29
3.5	Immunhistochemie	29
3.5.1	Kollagen II	29
3.5.2	Alpha smooth muscle actin (ASMA)	30
3.6	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	30
3.7	Auswertung der histologischen Verfahren	31
3.7.1	Auswertung histologischer Standardfärbungen	31
3.7.2	Auswertung der Enzymnachweise.....	32
3.7.3	Auswertung der Immunhistochemie	32
3.8	Statistische Auswertung	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Klinische Daten	35
4.2	Histopathologische Veränderung der Synovialmembran	38
4.3	Histopathologische Veränderung von Knorpel und Knochen.....	46
4.3.1	Knorpel	46
4.3.2	Knochen.....	53
4.3.3	Tabellarische Ergebniszusammenfassung	61

5	Diskussion.....	62
5.1	Das Tierversuchsmodell.....	62
5.2	Bewertung der Arthritis.....	63
5.3	Klinische Auswirkungen auf die Versuchstiere	66
5.3.1	Geschlechtsspezifische Unterschiede der Arthritisausprägung	66
5.3.2	Verlaufsbeobachtung im Belastungsscore.....	67
5.4	Auswirkungen auf die Synovialmembran.....	68
5.5	Auswirkungen auf die Gelenkknorpelflächen.....	69
5.6	Auswirkung auf den subchondralen Knochen.....	70
5.7	Die Rolle des NNCS.....	73
6	Ausblick.....	74
7	Zusammenfassung.....	75
8	Summary.....	77
9	Abkürzungsverzeichnis	78
10	Tabellenverzeichnis.....	81
11	Abbildungsverzeichnis.....	82
12	Literaturverzeichnis	83
13	Publikationsverzeichnis	99
14	Erklärung zur Dissertation	100
15	Danksagung.....	101
16	Lebenslauf	102

1 Einleitung

1.1 Klinisches Bild der rheumatoiden Arthritis (RA)

Die RA oder auch chronische Polyarthritits gehört zu den Autoimmunerkrankungen und ist eine der häufigsten entzündlichen Gelenkerkrankungen der Bevölkerung in Industrieländern. Das Risiko, an der Arthritis zu erkranken, beträgt für Frauen 3,6%, für Männer hingegen liegt es bei 1,7%. Hierbei steigt die Prävalenz mit zunehmendem Alter (Crowson et al. 2011).

Die klassische Verlaufsform der RA ist geprägt von Gelenkbeschwerden, welche häufig zuerst symmetrisch die Handgelenke, die Fingergrund- und mittelgelenke betreffen. Im weiteren Verlauf zeigen sich Überwärmung, Rötung, Schwellung sowie Druckschmerzhaftigkeit auch an größeren Gelenken und der Wirbelsäule. Insbesondere schmerzhaftige Bewegungseinschränkungen, vor allem die Morgensteifigkeit von ungefähr einer Stunde, schränken die Erkrankten in ihren alltäglichen Verrichtungen massiv ein (Grassi et al. 1998). Den Gelenkbeschwerden gehen häufig uncharakteristische Symptome wie Abgeschlagenheit, ungewollte Gewichtsreduktion, Appetitlosigkeit, Myalgien, subfebrile Temperaturen und starkes Schwitzen voraus.

Im weiteren Krankheitsverlauf können unterschiedlichste extraartikuläre Manifestationen, darunter Pleuritis, Perikarditis, Glomerulonephritis, systemische Vaskulitis, Lungenfibrose, Myopathie und Neuropathien auftreten. Des Weiteren finden sich krankheitsbedingte Komplikationen wie Gelenkfehlstellungen, Rheumaknoten, Karpaltunnelsyndrom, Sulcus-ulnaris-Syndrom, Baker-Zyste, osteoporotische Frakturen, zervikale Myelopathien, Infektionen der Atemwege, ischämische Herzerkrankungen und Non-Hodgkin-Lymphome im Verlauf der RA (Young und Koduri 2007). Generell lässt sich feststellen, dass die RA mit einem um bis zu 1,5- bis 1,6-fach erhöhten Mortalitätsrisiko einhergeht, welches vor allem durch kardiovaskuläre Ereignisse bedingt ist (Naz und Symmons 2007; Gabriel 2008; Sokka et al. 2008).

Bisher ist die tatsächliche Ursache der RA nicht eindeutig bekannt. Jedoch konnten in den letzten Jahren einige Aspekte der bestehenden Pathogenese aufgedeckt werden. Bei 50% der Erkrankten besteht eine genetische Veranlagung, welche durch das vermehrte Vorkommen von humanen Leukozytenantigenen (HLA) wie HLA-DRB1 nachgewiesen werden kann (Scott et al. 2010).

Inzwischen ist auch bekannt, dass bei der Autoimmunreaktion T- und B-Lymphozyten sowie Makrophagen und synoviale Fibroblasten Botenstoffe freisetzen, welche die Synovialzellen stimulieren und diese daraufhin gewebezerstörende Enzyme freisetzen,

allen voran den Tumor-Nekrose-Faktor Alpha (TNF-Alpha), welcher die Sekretion von Interleukin (IL)-1 und -6 fördert und damit weiter die Entzündungsreaktion verstärkt (Feldmann et al. 1996).

An der Verdickung der Synovialmembran (SM) sind sowohl die synovialen Makrophagen als auch die synovialen Fibroblasten beteiligt. Es wird angenommen, dass diese Makrophagen verstärkt proinflammatorische Zytokine produzieren, welche im weiteren Verlauf die typischen Gelenkzerstörungen fördern. Die synovialen Fibroblasten zeigten im Rahmen der RA ebenfalls durch eine Knorpelinvasion destruktives Verhalten (Scott et al. 2010).

Für die Diagnosestellung und Einteilung der RA haben 2010 das American College of Rheumatology und die European League Against Rheumatism eine neue Kriterienklassifikation erstellt, welche Erkrankte schon frühzeitig detektieren und einer geeigneten Therapie zuführen soll (Aletaha et al. 2010). Zu den Diagnosekriterien zählen unter anderem die Gelenkbeschwerden, Laborbefunde (hierunter allgemeine Entzündungszeichen wie die Blutsenkungsgeschwindigkeit und das C-reaktive Protein) sowie Rheumafaktoren, Autoantikörper gegen cyclisches citrulliniertes Peptid, antinukleäre Faktoren und die Bildgebung.

Da eine Heilung der RA derzeit nicht möglich ist, liegt der Schwerpunkt der Therapie auf der Hemmung des Entzündungsprozesses, der Schmerzlinderung und der Funktionserhaltung des Bewegungsapparats. Neben den physikalisch-balneologischen sowie den operativen Verfahren kommt der medikamentösen Therapie die größte Bedeutung zu.

Nach wie vor stellen die krankheitsmodifizierenden antirheumatischen Medikamente (DMARDs) wie Methotrexat oder Ciclosporin die Mittel der ersten Wahl dar (Camargo et al. 2016). Die nötige Langzeittherapie geht bei diesen Medikamenten mit erheblichen Nebenwirkungen von Leber- und Lungenerkrankungen bis hin zur Knochenmarkdepression einher. Die DMARDs werden vor allem im Rahmen der Initialtherapie bis zu ihrem Wirkungseintritt mit hochdosierten Glukokortikoiden kombiniert, welche stufenweise reduziert und im Verlauf gegebenenfalls abgesetzt werden. Durch die Einführung zytokinspezifischer Medikamente wie Infliximab, ein TNF-Alpha-Antagonist, wurde die RA-Behandlung revolutioniert. Diese haben einen schnelleren Wirkungseintritt als DMARDs, jedoch ist auch hier eine wiederholte, systemische Zufuhr nötig, um den Therapieerfolg zu gewährleisten. Derzeit finden sie Anwendung bei schweren Krankheitsverläufen und werden mit klassischen DMARDs zur Wirkungssteigerung kombiniert (Albrecht et al. 2014). Die selektiven Immunsuppressiva zeigen ebenfalls Nebenwirkungen, wie die Möglichkeit schwerer Infektionen, welche zu den unerwünschten Wirkungen der konventionellen DMARDs

und der Glukokortikoide hinzukommen können. Dazu finden sich Hinweise, dass die nötige Medikamentengabe die Ausprägung und das Auftreten von Komorbiditäten fördert (Gullick und Scott 2011; Al-Bishri et al. 2013).

Dementsprechend besteht ein dringender Bedarf an neuartigen medikamentösen Therapieformen, welche weniger systemisch immunsuppressiv wirken als die, die nach den Richtlinien derzeit zur Behandlung der RA eingesetzt werden (Smolen et al. 2010).

1.2 Das non-neuronale cholinerge System (NNCS)

Seit einigen Jahren hat sich die funktionelle Relevanz des NNCS, welches unabhängig von cholinergen Nerven agiert, etabliert und wurde zum Thema weitreichender Forschungen.

Dabei kann das Auftreten der einzelnen Komponenten des NNCS von Umgebungsstimuli, dem Zelltyp, dem Differenzierungsgrad der Zelle und der Zellaktivität abhängen (Wessler und Kirkpatrick 2008). Unter pathologischen Umständen kann es zu Veränderungen im Expressionsmuster der einzelnen Komponenten kommen, dies könnte Auswirkungen auf die physiologische Funktionalität der betroffenen Gewebe haben. Eine weitere Erforschung der verschiedenen Expressionsmuster in den unterschiedlichen Krankheitsbildern ist jedoch in vielerlei Hinsicht erforderlich.

Es befinden sich bereits Therapien, die auf das cholinerge System wirken, erfolgreich im klinischen Einsatz. In der Therapie von Morbus Alzheimer gilt die Gabe von Acetylcholinesterase (AChE)-Inhibitoren, welche den Spiegel des Neurotransmitters steigern, als Standard (Winslow et al. 2011). Antimuskarinische Medikamente kommen bei Erkrankungen wie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) (Gosens et al. 2006) und der überaktiven Blase (Andersson 2004) aussichtsreich zum Einsatz. Diese Medikamente zeigen je nach Dosis, Applikationsart und Spezifität relativ geringe Nebenwirkungen und stellen damit innovative Therapiekonzepte dar.

Acetylcholin (ACh)

Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckte Loewi bei Experimenten an isolierten Froschherzen den sogenannten „Vagusstoff“, welcher Nervenimpulse auf das Herz übertragen kann (Zimmer 2006). Dieser wurde später als die von Sir Henry Dale mit ACh bezeichnete Substanz identifiziert (Tansey 1991).

ACh ist sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem als klassischer Neurotransmitter bekannt. Allerdings kommt ACh ebenfalls eine große Bedeutung in

non-neuronalen Geweben zu, wo es als Signalmolekül parakrin und autokrin wirkt (Wessler et al. 1998). ACh wurde bereits in unterschiedlichsten Geweben und Zellarten nachgewiesen, darunter in glatten Muskelzellen, Mesothel, Epithel, Endothel und in immunkompetenten Zellen. Hierbei vermittelt es grundlegende Zellfunktionen wie Zelldifferenzierung, Zellproliferation, den physiologischen Zell-Zellkontakt sowie die Kontrolle der Entzündungsprozesse (Wessler und Kirkpatrick 2008).

Das NNCS wirkt im Vergleich zur synaptischen Übertragung wesentlich langsamer, aber langfristiger und dient der Aufrechterhaltung der körpereigenen Homöostase. Im NNCS werden geringere Mengen ACh sowie andere Speicher-, Synthese- und Freisetzungsmechanismen als im Nervensystem genutzt (Wessler und Kirkpatrick 2008).

Synthese und Metabolismus von ACh in non-neuronalen Zellen

Das Cholin, welches an der Bildung des ACh beteiligt ist, unterliegt einem Kreislauf (Abbildung 1). Es wird über den Cholintransporter (CHT1) aus dem Extrazellulärraum in den Intrazellulärraum befördert. Hier erfolgt die Entstehung von ACh aus Cholin und Acetyl-Coenzym A (AcCoA) mit Hilfe der Cholinacetyltransferase (ChAT). Die Funktion der ChAT kann allerdings auch durch das Enzym Carnitinacetyltransferase (CarAT) übernommen werden (Tucek 1982; Lips et al. 2007; Wolf-Johnston et al. 2012).

Die Lagerung erfolgt bis zur Freisetzung durch Exozytose in Vesikeln, in welche das ACh durch den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT) gelangt (Eiden 1998). Die nicht-neuronalen Zellen zeigen einen weiteren Mechanismus der kontinuierlichen ACh-Freisetzung ohne Zwischenlagerung in Vesikeln über organische Kationentransporter (OCTs) (Wessler et al. 2001). Das in den Interzellularraum abgegebene ACh kann jetzt die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Zielzelle eingehen. Daraufhin erfolgt die hydrolytische Spaltung des AChs in Cholin und Acetat. Diese Spaltung erfolgt über das Enzym AChE (Darvesh et al. 2003). Durch den CHT1 kann das Cholin zur erneuten ACh-Synthese zurück in den Intrazellulärraum transportiert werden.

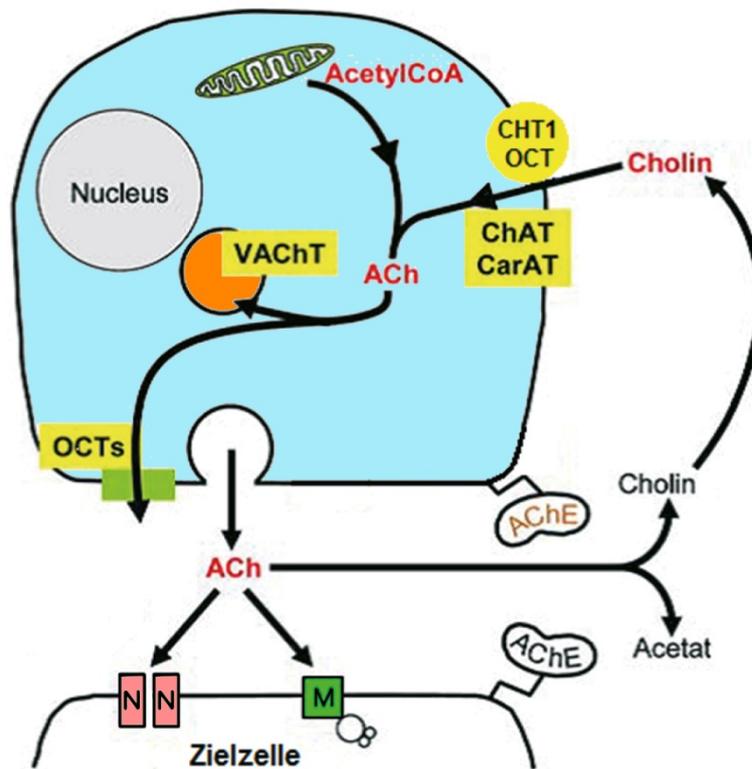


Abbildung 1: Das cholinerge System in non-neuronalen Zellen (modifiziert nach Kummer et al. 2008)

Aufnahme von extrazellulärem Cholin durch OCT oder CHT1, Bildung von ACh durch ChAT oder CarAT. ACh-Transport in Vesikeln mittels VACHT und Freisetzung via Exozytose oder direkte Freisetzung durch OCTs. ACh vermittelt über Rezeptoren an der Zielzelle. Die Spaltung erfolgt im interzellulären Raum durch die AChE in Cholin und Acetat.

ACh-Rezeptoren

Der Transmitter ACh kann an zwei unterschiedlichen cholinergen Rezeptorarten binden, an den Guanosintriphosphat-Protein-(G-Protein)-gekoppelten muskarinischen ACh-Rezeptor (MR) mit fünf Isoformen oder an den nikotinischen ACh-Rezeptor (nAChR), welcher in erster Linie als Ionenkanal auftritt. Bereits vor der Entschlüsselung der molekularen Strukturen wurde die Funktion dieser Rezeptoren durch die Wirkungen von Agonisten sowie Antagonisten untersucht. Die cholinergen Rezeptortypen wurden nach ihren entsprechenden Agonisten, dem Muskarin und dem Nikotin, benannt (Siegel 2006). Beide Rezeptortypen finden sich sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem und ebenso in Zellen, welche keine primäre Innervation von Neuronen erfahren. In diesen nicht-neuronalen Zellen ist das Expressionsmuster abhängig von exogenen und endogenen Umweltfaktoren, der Zelldifferenzierung, der Zellfunktion sowie der Zellart (Wessler und Kirkpatrick 2008).

Die nAChR sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, welche aus fünf Untereinheiten (UE) bestehen (Abbildung 2). Bei den Wirbeltieren sind 17 unterschiedliche UE ($\alpha 1$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ -

$\beta 4$, γ , δ und ϵ) bekannt (Millar und Harkness 2008), welche je nach Zusammensetzung Hetero- oder Homopentamere bilden. Durch die Vielfalt der Kombinationsmöglichkeiten entstehen diverse Rezeptor-Subtypen, welche sich durch ihre Eigenschaften wie Ligandenspezifität und Ligandenaffinität voneinander differenzieren (Siegel 2006).

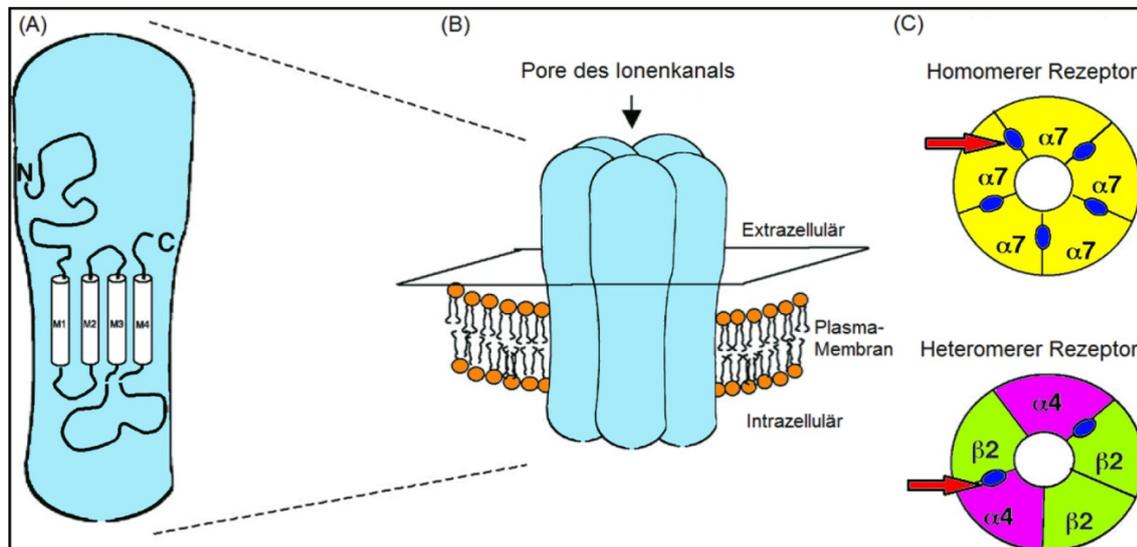


Abbildung 2: Struktur der nAChR (modifiziert nach Gotti und Clementi 2004)

In (A): nAChR-UE mit den extrazellulären N- und C-terminalen Abschnitten, den vier hydrophoben Transmembrandomänen und der intrazellulären Schleife; in (B): pentamere Zusammensetzung der nAChR-UEs; in (C): homomere $\alpha 7$ - sowie heteromere $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptor-Subtyp, Pfeile weisen auf die blau dargestellten ACh-Bindungsstellen der α -UE

Des Weiteren konnte das Vorkommen von nAChR in vielen nicht-neuronalen Zellen nachgewiesen werden, darunter im Atemwegsepithel (Carlisle et al. 2007), in Fibroblasten (Sekhon et al. 2002), im Epithel des Verdauungstraktes (Richardson et al. 2003), im Urothel (Lips et al. 2007) sowie in glatten Muskelzellen und Adipozyten (Wessler und Kirkpatrick 2008). Eine besondere Bedeutung kommt hierbei dem $\alpha 7$ -nAChR in der Immunreaktion zu (Tracey 2002). Dieser wird von verschiedenen Immunzellen exprimiert, wie von T- und B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen, Monozyten sowie von den fibroblastenähnlichen Synoviozyten (Jonge und Ulloa 2007; Kawashima et al. 2007; Waldburger et al. 2008) und scheint wesentlich an dem cholinergen antiinflammatorischen Signalweg beteiligt zu sein (Tracey 2002).

Die zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zählenden MR bestehen aus einem Glykoprotein, welches sieben Transmembranhelices ausbildet (Abbildung 3). Sie kommen sowohl im non-neuronalen als auch im neuronalen System in Form von fünf Subtypen (M_1R - M_5R) vor (Wess 1996; Caulfield und Birdsall 1998). Bei der Stimulierung von M_1R , M_3R und M_5R vermittelt das gekoppelte G_q -Protein einen

intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg (Felder 1995), während es sich bei den an M_2R und M_4R gekoppelten G-Proteinen um Mitglieder aus der Familie der G_i -Proteine handelt, welche die Synthese von zyklischem Adenosinmonophosphat, einem Signalmolekül, hemmen (Felder 1995; Caulfield und Birdsall 1998).

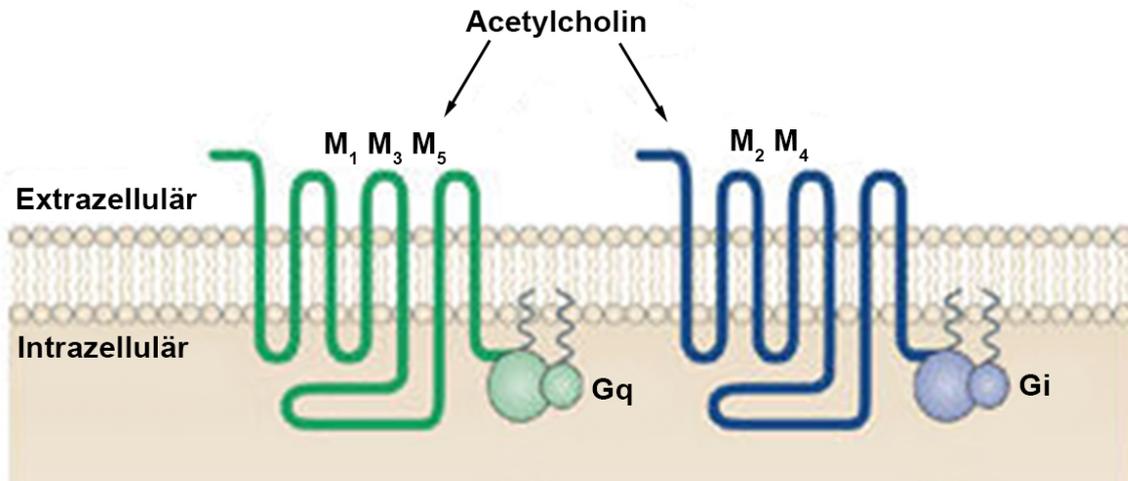


Abbildung 3: Schema der MRs mit Kopplung an die G-Proteine (modifiziert nach Wess et al. 2007)

Die fünf MR-Subtypen mit den entsprechenden G-Proteinen ($\text{M}_{1,3,5}\text{R}$ mit dem G_q -Protein und $\text{M}_{2,4}\text{R}$ mit dem G_i -Protein)

Die Anwesenheit von MRs konnte in einer Vielzahl von nicht-neuronalen Geweben nachgewiesen werden, hierbei hängt ihre Wirkung von der Funktion der unterschiedlichen Zelltypen ab (Wessler und Kirkpatrick 2008). Es konnten alle fünf Subtypen der MRs in Lymphozyten und Endothelzellen nachgewiesen werden sowie M_1R und M_3R in den Oberflächenepithelzellen der Atemwege (Wessler und Kirkpatrick 2008). Auch in den drei Abschnitten des Dünndarms von Mäusen gelang der Nachweis aller MR-Subtypen (Muisse et al. 2017). Grando et al. konnten im Verlauf des Differenzierungsprozesses von Keratinozyten ebenfalls M_1R - M_5R je nach Stadium in unterschiedlicher Ausprägung der Subtypen nachweisen (Grando et al. 2006). Über die M_2R werden die Bildung von Extrazellulärmatrix (EZM) sowie die Proliferation von Fibroblasten in der Lunge gelenkt (Matthiesen et al. 2006). In der glatten Muskulatur der Atemwege werden M_2R und M_3R exprimiert. Durch eine Stimulation der MR in diesen Zellen kommt es neben der Produktion von EZM auch zu einer Ausschüttung von Chemokinen sowie Zytokinen. Das könnte zur Hypertrophie glatter Muskelzellen, zur Ausbildung von Fibrosierungen der Atemwege und zu Entzündungen führen (Meurs et al. 2013).

Es scheint, als könnte mit Hilfe der MRs und der nAChRs die Regulation von Immunreaktionen gemeinsam vermittelt und reguliert werden. In der Milz wird die Bildung von proinflammatorischen Substanzen wie dem TNF-Alpha durch die Stimulierung von M₁R und M₅R angeregt (Kawashima et al. 2012). Anders der oben erwähnte $\alpha 7$ -nAChR, welcher die Produktion von inflammatorischen Zytokinen inhibiert (Kawashima et al. 2007).

Das Vorkommen des NNCS im Gelenk

Der erste Nachweis einer Komponente des NNCS in Strukturen von Gelenken gelang Grimsholm et al. durch das Auffinden der ChAT im synovialen Gewebe des menschlichen Kniegelenks (Grimsholm et al. 2008), gefolgt von der Entdeckung des $\alpha 7$ -nAChR ebenfalls im synovialen Gewebe des Menschen (Westman et al. 2009). 2012 konnte erstmalig das Vorkommen von Enzymen für die ACh-Synthese sowie den Abbau, das Vorhandensein von ACh-Transportern und die Expression von verschiedenen nAChRs wie auch MRs im synovialen Gewebe des menschlichen Knies bewiesen werden (Schubert et al. 2012).

2015 konnte im humanen Gelenk das Vorkommen aller notwendigen Komponenten des NNCS sowohl im Knorpel als auch in der SM belegt werden. Für die Cholinaufnahme konnten in der SM und dem Knorpel der OCT1 und Mitglieder der Cholin-transporter-like (CTL)-Proteinfamilie nachgewiesen werden. Bei der Cholinaufnahme im Knorpelgewebe könnte auch der klassische CHT1 beteiligt sein. Die ACh-Abgabe erfolgt in beiden Geweben vermutlich direkt über CTL4 oder über OTCs, da kein VAcHT exprimiert wird. In den fibroblastenartigen und makrophagenartigen SM-Zellen kommen die Transporter CTL1, CTL2 und die CarAT vor. Dies lässt eine mögliche ACh-Produktion in diesen Zellen vermuten (Beckmann et al. 2015). Der Nachweis des NNCS mit seinen einzelnen Komponenten im menschlichen Gelenk ermöglicht somit einen denkbaren neuen Therapieansatz unter anderem im Krankheitsbild der RA.

Der cholinerge antiinflammatorische Signalweg

Dieser Signalweg wurde im Jahr 2000 in einer Studie beschrieben (Borovikova et al. 2000). Hier konnten durch die Stimulation des Vagusnervs die Ausschüttung von entzündungsfördernden Zytokinen wie TNF-Alpha, IL-1Beta, IL-6 und IL-18 reduziert und das Auftreten eines Kreislaufversagens im Rahmen einer künstlich induzierten Endotoxinämie bei Ratten verhindert werden (Borovikova et al. 2000).

Anfänglich wurde angenommen, dass die Milz an dem antientzündlichen Effekt beteiligt ist, da während der Endotoxinämie in ihr große Mengen von systemischem TNF-Alpha

produziert werden (Huston et al. 2006). Allerdings konnte keine direkte Innervation der Milz durch den zehnten Hirnnerv nachgewiesen werden (Bellinger et al. 1993). Rosas-Ballina et al. gingen von einer indirekten Koppelung aus, wobei vagale präganglionäre Neurone auf den N. splenicus, welcher sympathischen Ursprungs ist, umgeschaltet werden und mit dem Nerv in die Milz ziehen (Rosas-Ballina et al. 2008). In einer späteren Studie konnten jedoch weder anatomische noch funktionelle Verbindungen zwischen den sympathischen Neuronen und den vagalen Fasern gefunden werden (Bratton et al. 2012). Daraufhin zeigten Martelli et al. eine nicht-neuronale Verbindung zwischen dem Vagus und der Milz auf (Martelli et al. 2014). An den peripheren Nervenendigungen der Milz befinden sich sympathische Fasern mit dem $\alpha 7$ -nAChR. Erfahren die $\alpha 7$ -UE eine Stimulation durch ACh, welches von T-Zellen freigesetzt wird (Rosas-Ballina et al. 2011), sezernieren die Nervenendigungen Noradrenalin. Das Noradrenalin kann an β -adrenerge Rezeptoren der Milz-Makrophagen binden und die TNF-Alpha-Produktion hemmen (Martelli et al. 2014).

Der cholinerge antiinflammatorische Signalweg kann neben der direkten Vagusstimulation auch durch die Gabe von Agonisten wie Nikotin, welches spezifisch an den $\alpha 7$ -nAChR der Makrophagen bindet (Fodale und Santamaria 2008), oder Cholinesterasehemmern wie Physostigmin ausgelöst werden (Hofer et al. 2008). Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe um Wang mit Hilfe des $\alpha 7$ -nAChR-Antagonisten, α -Bungarotoxin, an Makrophagen zeigen, dass keine entzündungshemmende Wirkung nach der Rezeptorblockade von Nikotin oder ACh mehr ausging. Der gleiche Effekt konnte auch bei Knockout-Mäusen mit Deaktivierung des $\alpha 7$ -nAChR-Gens beobachtet werden (Wang et al. 2003).

Die Effekte des cholinergen non-neuronalen Signalwegs wurden inzwischen in verschiedenen Krankheitsbildern untersucht, hierbei kamen die direkte Vagusstimulation, die Gabe von $\alpha 7$ -nAChR-Agonisten sowie von AChE-Hemmern zum Einsatz. Bei der an Mäusen induzierten Colitis ulcerosa konnte durch die Gabe von $\alpha 7$ -nAChR-Agonisten eine Abschwächung der Krankheitssymptome erreicht werden (Bai et al. 2007). Durch die Vagusstimulation konnte an Morbus-Crohn-Patienten eine komplette Remission sowohl klinisch und laborchemisch als auch endoskopisch erreicht werden (Bonaz et al. 2016). Durch Paraoxon, einen irreversiblen AChE-Hemmer, konnte eine mögliche Rolle des cholinergen antiinflammatorischen Signalwegs in der Verhütung von Diabetes Typ I aufgezeigt werden (George et al. 2016). In der RA-Behandlung von Menschen wurde erstmalig gezeigt, dass die Vagusstimulation die Ausschüttung von TNF-Alpha und IL-6 hemmt und ein Rückgang der klinischen Symptome zu verzeichnen war, dies sogar bei einigen therapieresistenten Erkrankten (Koopman et al. 2017; Koopman et al. 2016). All diese

Studien zeigen die Bedeutung des cholinergen antiinflammatorischen Signalwegs als potentiell vielversprechendem therapeutischen Ansatz für diverse entzündliche Erkrankungen.

Der M₃R als therapeutische Zielstruktur zur Therapie der RA

Die Signalwege, über welche die MRs wirken, verlaufen zum Teil G-Protein-abhängig wie auch -unabhängig (Nathanson 2000). Ebenso spielt hierbei ihre Lokalisation und molekulare Struktur eine entscheidende Rolle (Wess et al. 2007). Die mit am besten untersuchte Wirkung der MRs ist ihre Rolle bei der Kontraktion glatter Muskulatur in den Atemwegen, dem Ileum und der Harnblase. Die Hauptrolle wird hier dem M₃R zugesprochen. Zur Behandlung der hyperaktiven Blase werden M₃R-Antagonisten erfolgreich eingesetzt (Wess et al. 2007) und M₃R-Agonisten kommen zur Therapie der trockenen Mundschleimhaut beim Sjögrens-Syndrom zum Einsatz (Gautam et al. 2004). Ebenfalls unterstützt dieser Rezeptor-Subtyp die Aufrechterhaltung des physiologischen Blutzuckerspiegels, die Freisetzung von Insulin und die Glucosetoleranz in den β -Zellen des Pankreas (Gautam et al. 2007). Des Weiteren scheint er durch Beeinflussung der Adhäsion und Migration von Keratinozyten der Wundheilung zu dienen (Chernyavsky et al. 2004). Eine weitere entscheidende Rolle kommt dem M₃R vermutlich bei der Progression und der Invasion von Neoplasien des Dickdarms zu (Cheng et al. 2017).

Es ist bekannt, dass MRs auf verschiedensten Zelltypen exprimiert werden, unter anderem auch von Immunzellen. Ihre Stimulation kann proinflammatorische Effekte bewirken. MR-Agonisten wie Carbacholine haben zu einer Erhöhung der Leukozytenzahl in der Vena splenica geführt, dies konnte durch die Gabe von Atropin, einem MR-Antagonisten, verhindert werden (Sandberg 1994). Ebenfalls konnten durch die Atropinwirkung an den MR eine Verminderung der T-Zell-Antwort, eine schwächere Entzündung und geringere Gewebeerstörungen bei Ratten erreicht werden (Razani-Boroujerdi et al. 2008), dabei scheint der M₃R eine vorrangige Rolle zu spielen. An Mäusen konnten Xu et al. zeigen, dass der M₃R für die Rekrutierung von Monozyten und Neutrophilen sowie die TNF-Alpha-Produktion in alveolären Makrophagen im Rahmen einer induzierten Lungenentzündung verantwortlich ist (Xu et al. 2012). Des Weiteren konnte bei COPD-Patienten eine Dysregulation mit verstärkter Expression von M₃R auf Lungenfibroblasten beobachtet werden (Profita et al. 2005). Auch bei systemischen Entzündungen wie der Sepsis konnten die proinflammatorischen Effekte der MRs gezeigt werden. Atropin senkte hingegen auch hier die Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen und führte zu einer erhöhten Überlebensrate bei Mäusen mit Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Endotoxinämie (Fuentes et al. 2008).

Bei direkter Zellstimulation mit Carbachol, einem M₃R-Agonisten, konnte über die Induktion von NF-κB eine erhöhte Produktion von proentzündlichen Chemokinen und Zytokinen erreicht werden (Zheng et al. 2004).

All diese Erkenntnisse zeigen, dass der M₃R einen therapeutischen Ansatz nicht nur für Erkrankungen mit Beteiligung der glatten Muskulatur, sondern auch für Erkrankungen entzündlicher Natur bieten könnte.

Es wurde berichtet, dass durch die Aktivierung von M₃Rs eine Proliferation bronchialer Fibroblasten erreicht werden konnte (Pieper et al. 2007). Die gesteigerte Proliferation synovialer Fibroblasten gilt als wesentlicher Faktor bei der Pannusbildung im arthritischen Gelenk, welcher unter anderem für die Gelenkzerstörung ursächlich ist. Sowohl der entzündliche als auch der proliferative Effekt wird über den Signalweg der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) vermittelt (Matthiesen et al. 2007). In experimentellen Arthritismodellen zeigt die Inhibierung des MAPK-Signalwegs vielversprechende Erfolge und könnte somit als therapeutische Zielstruktur nutzbringend eingesetzt werden (Paunovic und Harnett 2013). Zwei weitere wichtige Arthritismediatoren, zum einen das Enzym Calcineurin (Rossler et al. 2008) und zum anderen der Transkriptionsfaktor c-fos (Suriyo et al. 2008), können über die Stimulation von M₃R induziert und aktiviert werden. Wird Calcineurin durch eine Überexpression des Calcineurin-bindenden Proteins inhibiert, kommt es zu einer Symptomlinderung in der experimentellen Arthritis (Yu et al. 2012). Im Krankheitsbild der RA ist zudem c-fos erhöht, dies kann die Proliferation von synovialen Fibroblasten fördern sowie zu einer gesteigerten Differenzierung von Osteoklasten führen und hierdurch die Gelenkdestruktion verstärken (Tsuji et al. 2000).

Der proliferative Effekt sowie die entzündungsfördernde Wirkungsweise des M₃R erlauben die Vermutung, dass er einen wesentlichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der RA haben kann. Die hier genannten Fakten lassen auf eine mögliche protektive Wirkung der M₃R-Defizienz schließen und dienen als Anlass, die Bedeutung des M₃Rs im Krankheitsbild der RA zu untersuchen.

1.3 Aufbau eines Gelenks

Typischerweise setzen sich Gelenke aus den Gelenkenden von zwei oder mehr Knochen, welche mit hyalinem Knorpel überzogen sind, der Gelenkhöhle und der umgebenden Gelenkkapsel zusammen (Soder und Aigner 2011). Des Weiteren kommen Gelenkbänder, Fettpolster und Menisci oder Disci articulares zum Ausgleich von inkongruenten Gelenkflächen in einigen Gelenken vor.

Der Gelenknorpel

Der hyaline Knorpel als zentrales Funktionselement im Gelenk mit einer Dicke von 0,5 bis 5 Millimeter (mm) dient dem darunterliegenden Knochen als Stoßdämpfer und verteilt großflächig die entstehende Spannung (Mow et al. 1992). Er setzt sich aus einer nicht innervierten und avaskulären EZM und den in ihr eingebetteten Chondrozyten zusammen. Die in kleinen Gruppen zusammenliegenden Chondrozyten sind von einer perizellulären Kapsel, welche sie vor mechanischen Belastungen schützt, umgeben. Diese funktionelle Einheit wird als Chondron bezeichnet (Poole et al. 1987). Die Chondrozyten, welche die EZM produzieren, machen nur ungefähr 10% der gesamten Knorpelmasse aus (Muir 1995). Die EZM ist reich an wasserbindenden Proteoglykanen (z.B. Fibronectin und Aggrecan) sowie Glykosaminoglykanen wie Hyaluronsäure und beinhaltet eine zugfeste Kollagenmatrix (hauptsächlich Kollagen Typ II, aber auch Typ V, IX, X und XI (Cohen et al. 1998; Eyre 2002)). Der Gelenknorpel enthält 60-80% Wasser, dies ermöglicht seine klassischen Eigenschaften und die Ernährung der Chondrozyten (Muir 1995), wobei er selbst nicht vaskularisiert ist. Seine Versorgung erfolgt oberflächlich über die Synovia und die tieferen Anteile werden von dem Knochen über Diffusionsprozesse miternährt (Burr 2004; Soder und Aigner 2011). Durch die Knorpelzellen findet im gesunden Gelenk ein kontinuierlicher Matrixumbau durch Neusynthese und Abbau mittels Wachstumsfaktoren und Zytokinen statt (Dijkgraaf et al. 1995). Um dieses Gleichgewicht zum Erhalt des Gelenknorpels und den Austausch von Abbau- und Nährstoffen zu erreichen, ist ausgewogene Bewegung im Bereich des Gelenks essentiell (Buckwalter 1995). Bei einer Belastung erfolgt die Kompression des Knorpels, dabei tritt Flüssigkeit aus der Matrix, während der Entlastung erfolgt ein Flüssigkeitsrückstrom. Hierbei gelingt der Austausch von Metaboliten und Stoffwechselprodukten. Da sich reife Chondrozyten im gesunden Knorpel kaum teilen (Telhag und Havdrup 2009), ist die Knorpelregeneration nur begrenzt möglich. Kleinere Schäden können durch Synthese von Matrixkomponenten wie Kollagenfibrillen ausgeglichen werden und somit die Funktionsfähigkeit des Gelenks über viele Jahre aufrechterhalten. Bei größeren Knorpelschäden kann nicht ausreichend hyaliner Knorpel ersetzt werden und die Defekte werden mit mechanisch unvorteilhaftem Faserknorpel oder Pannusgewebe ersetzt (Soder und Aigner 2011), was zu einer erheblichen Funktionseinschränkung führen kann.

Histologisch zeigt sich im intakten Gelenknorpel eine Zonengliederung mit vier Zonen. In der Tangentialzone verlaufen die Kollagenfibrillen parallel zur Oberfläche, während sie über die Übergangs- und Radiärzone bis zur Zone des kalzifizierten Knorpels hinab- bzw. hinaufziehen, wo sie verankert sind. Die Zone des mineralisierten Knorpels

ist mit dem folgenden Knochen verzahnt und von der Radiärzone durch eine Grenzlinie (tide mark) deutlich zu differenzieren (Cohen et al. 1998).

Das Synovium

Die Gelenkkapsel wird außen von der Membrana fibrosa und innen von der SM gebildet. Die SM wiederum besteht aus einer synovialen Intima ohne eine Basalmembran, die wenige, locker aufliegende Zellschichten beinhaltet, und einer lokal unterschiedlich gestalteten Subintima, welche Blutgefäße, Nervenfasern und auch Fettgewebe enthalten kann (Lindblad und Hedfors 1987). Die SM erstreckt sich im gesunden Gelenk nicht über den Gelenkknorpel und zeigt zwei Zelltypen. Die synovialen Makrophagen, auch als A-Zellen bezeichnet, und die synovialen Fibroblasten, als B-Zellen bekannt. Die synovialen Zellen dienen zum einen der Säuberung der Gelenkhöhle mittels Phagozytose und der Produktion der Synovia (Henderson und Pettipher 1985; Mor et al. 2005). Vor allem die B-Zellen sind an der Volumenregulation, der Zusammensetzung der Synovia sowie der EZM und auch an Entzündungsreaktionen beteiligt (Mor et al. 2005). Der kontrollierte Matrixumbau erfolgt über die Freisetzung von MMPs zum Matrixabbau und deren Hemmern, den tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) (Firestein und Paine 1992; Firestein 1996), sowie über Sezernierung von Kollagen, Hyaluronsäure und Fibronectin (Henderson und Pettipher 1985). Smith et al. konnten in gesunden Gelenken verschiedene Stoffe wie antiinflammatorische IL1-Rezeptor-Antagonisten, das knochenprotektive Osteoprotegerin und eine reduzierte Menge von Adhäsionsmolekülen nachweisen, welche gemeinsam für ein antiinflammatorisches Milieu sorgen (Smith et al. 2003). Hierdurch können matrixabbauende, entzündliche Prozesse verhindert werden.

Die Synovia

Die Synovialflüssigkeit ist ein klares, leicht gelbliches und visköses Dialysat aus dem Blutplasma, welches von der SM gebildet wird. Die Synovia hat hauptsächlich zwei Aufgaben. Die Gelenkflüssigkeit verstärkt das reibungsfreie Gleiten der glatten Knorpeloberflächen (Lubrikation) und versorgt zum großen Teil den nicht vaskularisierten Knorpel mit Nährstoffen wie Glucose. Ebenfalls enthält sie Proteine, die dem Blutplasma entstammen (Mor et al. 2005; Soder und Aigner 2011) und Bestandteile, welche von den Knorpelzellen und Synoviozyten sezerniert werden. Sie ist durch enthaltene Proteoglykane und Hyaluronsäure ein ausgezeichnetes visköses Gleitmittel (Thier und Tonak 2017). Vor allem das Proteoglykan-4, auch bekannt als Lubrizin, spielt bei der Gelenkschmierung eine entscheidende Rolle und wird von Chondrozyten der Tangential- und Übergangszone produziert und zu kleinen Teilen

auch von Synoviozyten (Flannery et al. 1999). Es befindet sich auf der Oberfläche des hyalinen Knorpels im Gelenk und verbessert hier maßgeblich das Gleitverhalten. Die Hyaluronsäure wird hingegen hauptsächlich in der Plasmamembran der Synoviozyten gebildet. Dabei macht sie einen erheblichen Bestandteil der Synovia aus. Die Hyaluronsäure sichert durch die Bindung von unter anderem Aggrecan die viskoelastischen Eigenschaften des Gelenkknorpels, begünstigt sein Reibungsverhalten (Thier und Tonak 2017) und scheint den Erhalt eines physiologischen Phänotyps von Knorpelzellen zu unterstützen (Wu et al. 2017).

Pathologische Gelenkveränderungen durch die RA

Die für die RA typischen Gelenkveränderungen sind makroskopisch die Gelenkschwellung, Rötung und später Deformation. Histologisch ist eine Verbreiterung der SM mit infiltrativem Wachstum, erheblicher Zellinvasion, Gefäßvermehrung und der Bildung von Pannusgewebe zu sehen (Abbildung 4). Zu den frühen Veränderungen der SM zählt die verringerte Apoptose der synovialen Zellen (Matsumoto et al. 1996). Durch die erhöhte Lebensdauer kommt es zur Akkumulation, welche wiederum zur Hyperplasie der SM beitragen kann. Ebenfalls kommt es zur Migration von Entzündungszellen wie Makrophagen, Leukozyten, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und zu einer vermehrten Angiogenese (Zvaifler und Firestein 1994; Bodolay et al. 2002). Das Ungleichgewicht von angiogenetischen Faktoren und den entsprechenden Inhibitoren führt zu einer Gefäßneubildung im Synovium durch eine Aktivierung des Endothels (Koch 1998; Lee und Weinblatt 2001). Die Migration von Leukozyten aus dem Gefäßsystem in das Synovium wird somit ermöglicht. Es erfolgt eine andauernde Gefäßneubildung, welche durch die Hypoxie in den Gelenken von RA-Erkrankten noch verstärkt wird. Proangiogenetische Faktoren wie der vascular endothelial growth factor (VEGF) oder der basic fibroblast growth factor (bFGF), entzündungsfördernde Zytokine wie IL-1 und TNF-Alpha sowie Matrix-degradierende Enzyme werden vermehrt exprimiert (Koch et al. 1994; Veale und Fearon 2006; Akhavan et al. 2009). Die genannten Faktoren tragen alle zur Aktivierung des Endothels bei, was zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Gefäße sorgt und damit die Migration von Zellen und die Neoangiogenese selbst fördert.

Der Gelenkknorpel wird destruiert, verliert seine glatte Oberfläche bis zum Offenliegen des subchondralen Knochens und wird von Pannus überdeckt (Abbildung 4). Klassischerweise beginnt die Knorpelinvasion durch den Pannus meist an dem Übergangsbereich von Knorpel und Knochen. Dieser Knorpelverlust sorgt zum Teil mit für die in der Bildgebung sichtbare Gelenkspaltverengung (Mor et al. 2005). Eine weitere Ursache für den Knorpelverlust könnte bei den Matrix-Metalloproteasen (MMP)

liegen. Diese werden bei der RA in großen Mengen von den synovialen B-Zellen freigesetzt und können die EZM zerstören (Gravallese et al. 1991; Lee und Weinblatt 2001). Im physiologischen Gelenk sind die MMPs am Matrixumbau beteiligt und werden unter anderem durch die TIMPs reguliert. Bei der RA wird vermutet, dass die Aktivität der MMPs durch Zytokine wie IL-1 und TNF-Alpha erhöht ist und so zusätzlich die Knorpel- und Knochendestruktion intensiviert (Martel-Pelletier et al. 1994; Dayer et al. 1985).

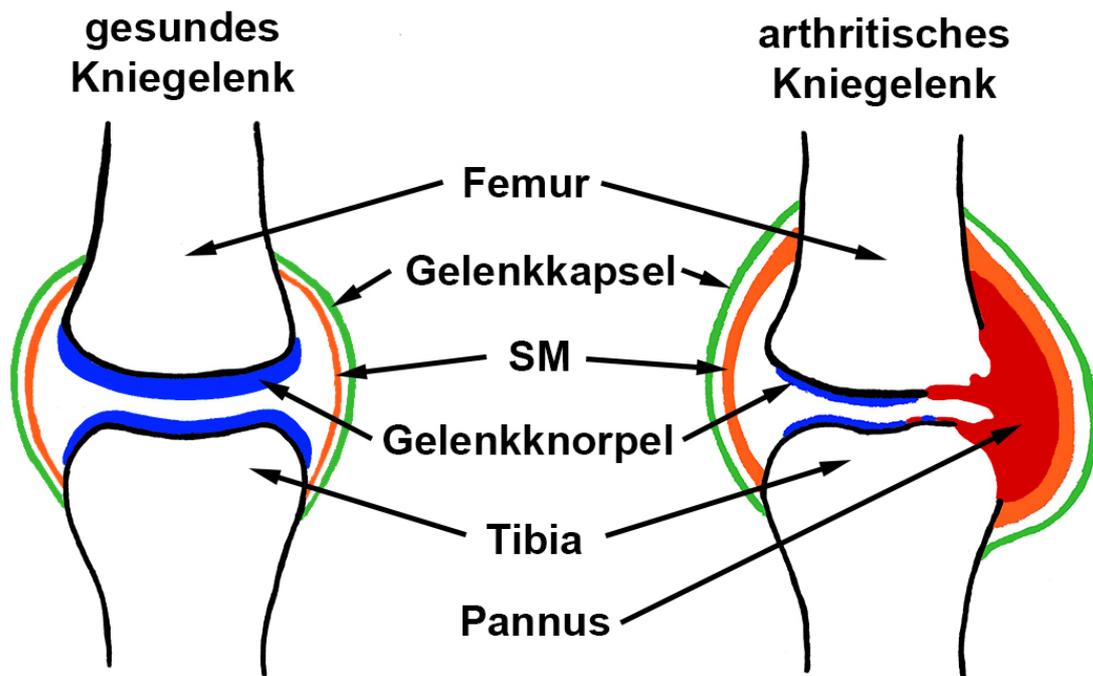


Abbildung 4: Schematische Darstellung des gesunden und des arthritischen Kniegelenks
 Links im Bild vereinfachte schematische Darstellung des Knies ohne Meniskus und Bandstrukturen; rechts im Bild sind einige Pathologien des arthritischen Kniegelenks dargestellt: die Gelenkschwellung, die Verbreiterung der SM mit dem von ihr ausgehenden Pannus, welcher sowohl den Knochen als auch den Gelenkknorpel überwuchert und infiltriert sowie der Knorpelverlust und die erodierte Knorpeloberfläche.

Der Knochen wird im Rahmen der RA ebenfalls destruiert. Inzwischen wird vermutet, dass die Erosionen in erster Linie von Osteoklasten verursacht werden. Die Osteoklasten-Differenzierung von Makrophagen-Vorläuferzellen wird durch Zytokine wie den osteoclast differentiation factor (ODF) oder den receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) gesteuert (Jones et al. 2002). Dabei steuert ODF nicht nur die Differenzierung, sondern auch die knochenabbauende Aktivität der Makrophagen. Im rheumatoiden Gelenk finden sich zwei Zellarten, welche ODF synthetisieren können, die synovialen B-Zellen und aktivierte T-Zellen (Gravallese et al. 2000). RANKL wird

ebenfalls von beiden Zellarten im rheumatoiden Gelenk freigesetzt, wobei hier die synovialen B-Zellen im Vordergrund stehen und die Differenzierung der Osteoklasten und die Knochendestruktion fördern (Danks et al. 2016). So könnten die synovialen Fibroblasten über die Stimulation von Osteoklasten die Knochendestruktion vorantreiben. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Typ-B-Synoviozyten in der Lage sind, selbst in den Knochen vorzudringen und zu resorbieren (Pap et al. 2003). All diesen pathologischen Veränderungen liegen unterschiedliche Mechanismen und Signalwege zugrunde, welche noch nicht abschließend beforscht wurden. Allerdings führen diese massiven Pathologien je nach Ausprägung zu einer Funktionseinschränkung bis hin zu einem Funktionsverlust der betroffenen Gelenke und dadurch zu einer Symptomatik bei den erkrankten Patienten.

2 Fragestellung

Die Auswirkung einer Aktivierung oder Inhibierung des M_3R ist für einige Organe sowie Krankheiten bereits bekannt und ermöglicht über die Gabe von Antagonisten bzw. Agonisten eine vielversprechende Therapieoption für die Erkrankten. Sein Einfluss auf die RA ist bisher noch nicht geklärt, wobei er auch hier eine Schlüsselrolle einnehmen könnte.

In dieser Arbeit sollen die Auswirkungen einer M_3R -Defizienz auf die Gelenkveränderungen und die klinische Belastung im Rahmen der Kollagenantikörper-induzierten Arthritis (CAIA) im murinen Modell untersucht werden.

Nachfolgende Fragen stehen hierbei im Vordergrund:

1. Wie wirkt sich die M_3R -Defizienz auf die klinische Belastung der Mäuse im Rahmen des CAIA-Modells aus?
2. Hat die M_3R -Defizienz Effekte auf die makroskopische Ausprägung der Arthritis?
3. Beeinflusst das Fehlen von M_3R die mikroskopischen, für die RA typischen Gelenkdestruktionen insbesondere in den Strukturen SM, Knorpel und Knochen?

Die Ergebnisse dieser Studie könnten erste Hinweise auf die Rolle des M_3R im komplexen Krankheitsbild der RA geben und damit langfristig mögliche neue Therapiestrategien eröffnen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Firmenname und Firmensitz
Aceton	Stockmeier, Bielefeld, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Alcianblau	Chroma, Münster, Deutschland
Ampli Taq Gold Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland
Antibody Diluent	Dako, Hamburg, Deutschland
Aqua ad injectabilia (Aqua inj.)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
BCIP/NBT Phosphatase Substrat	KPL, Gaithersburg, Maryland, USA
Bleicitrat	Plano, Wetzlar, Deutschland
Brilant Crocein Säurefuchsin	Waldeck, Münster, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, München, Deutschland
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, St. Louis, USA
Cacodylsäure	SERVA, Heidelberg, Deutschland
DePeX	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumtartrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
dNTPs	ProMega medicine, WI, USA
Echtrotsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Epon	Serva, Heidelberg, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Stockmeier, Bielefeld, Deutschland
Eukitt	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Glutardialdehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hyaluronidase	BiLlogo, Kronshagen, Deutschland
Kaisers Glyceringelantine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lichtgrün	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lipopolysaccharide von E. Coli _{0111:B4}	Chondrex Inc., Redmond, WA, USA

Magnesiumchlorid (MgCl₂)	Roche, Mannheim, Deutschland
Mausserum	BioSell, Nürnberg, Deutschland
Mayers Hämalaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
Naphthol-AS-TR-Phosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
N-N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Osmiumtetroxid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Paraffin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Puffer II	Roche, Mannheim, Deutschland
Perjodsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Phosphorwolframsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pikrinsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Proteinase K	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Saffron du Gatinais	Waldeck, Münster, Deutschland
Safranin	Waldeck, Münster, Deutschland
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schiffssches Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
SYBR Green	Bio-Rad, München, Deutschland
Technisches Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Toluidinblau O	Waldeck, Münster, Deutschland
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Triton-X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Uranylacetat	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H₂O₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Weigerts Hämatoxylin	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Xylol	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ziegen Serum	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
100 bp DNA ladder	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland

3.1.2 Kits

Tabelle 2: Verwendete Kits

Kit	Firmenname, Firmensitz
DNeasy Blood & Tissue Kit (250)	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Nova Red Substrat-Kit	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
Vectastain Elite ABC-Kit	BioLogo, Kronshagen, Deutschland

3.1.3 Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Antikörper	Wirtsspezies	Konjugat	Verdünnung/ Konzentration	Firmenname, Firmensitz
anti-alpha-smooth-muscle-actin	Kaninchen		1:100	Acris, Herford, Deutschland
Anti-Collagen Typ II	Kaninchen		1:3000	BioLogo, Kronshagen, Deutschland
Arthrogen-CIA® 5-Clone Cocktail Kit	Kaninchen		0,2 mg/gKG	Chondrex, Inc., Redmond, WA, USA
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Biotin	1:500	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA

3.2 Tiermodell

Der Einfluss von rheumatoider Arthritis wurde im Modell der CAIA an ca. 12 Wochen alten sowohl weiblichen als auch männlichen M₃R-defizienten Mäusen (B6.12926-CF-Chrm3^{tm1JW^e}) im Vergleich zu entsprechenden C57BL/6NTac-Wildtyp (WT)-Mäusen untersucht. Die Mäuse wurden freundlicherweise durch Prof. Jürgen Wess (NIH, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt.

Der Tierversuch wurde vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (GI20/28 Nr. 52-2013) und in dem Tierstall der Biochemie (TBI) der Universität Gießen durchgeführt.

Die Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus in Käfigen gehalten und erhielten Futter und Wasser ad libitum. Über den Versuchszeitraum wurde Käfigeinstreu auf Zellstoffbasis (AlphaDri; SDS, Altrip, Deutschland) verwendet.

3.2.1 Genotypisierung

Die Notwendigkeit der Genotypisierung ergab sich aus den anfänglich heterozygoten Zuchtbedingungen und diente der Differenzierung in homozygote WT, homozygote M₃R-defiziente und heterozygote Mäuse.

Isolation genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus Mäuseschwänzen

Die Isolation genomischer DNA erfolgte mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kits, welches nach den Herstellerangaben genutzt wurde.

Die abgetrennten Mäuseschwanzspitzen wurden einzeln mit dem Skalpell mechanisch zerkleinert und in entsprechende 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach Zugabe von 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K wurden die Proben über Nacht bei 56°C im Thermo Mixer compact (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei ca. 700 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben gevortext (Vortexer Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, New York, USA) und mit jeweils 200 µl AL-Puffer und 200 µl 100% Ethanol versetzt, erneut gevortext und auf eine DNeasy-Säule gegeben. Es erfolgte eine Zentrifugation (Zentrifuge Mikro 22R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) für 1 Minute (min) bei 6000 g. Danach wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 500 µl AW1-Puffer befüllt. Nach erneuter Zentrifugation (1 min bei 6000 g) wurde 500 µl AW2-Puffer auf die Säule gegeben. Nun wurden die Proben für 3 min bei 20000 g zentrifugiert, danach wurden die Säulen in entsprechende 1,5 ml Eppendorfgefäße umgesetzt. Zur Elution der genomischen DNA wurde die Membran mit 150 µl AE-Puffer direkt benetzt, für 1 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und für 1 min bei 6000 g zentrifugiert. Danach wurde die Säule verworfen und die isolierte DNA konnte weiterverwendet werden.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für den PCR-Nachweis des entsprechenden Genotyps der Maus wurden die Primer aus Tabelle 4 verwendet.

Tabelle 4: M₃R-Primer-Mix

	Primer	Sequenz	Länge (Basenpaare)
WT-Allel	M3A3 (forward)	ACC AAG ACC ACA GTA GCA GTG	226
	M3B (reverse)	CTC TCT ACA TCC ATA GTC CC	
Knockout- Allel	M3NEO9 (forward)	TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG G	170
	M3B (reverse)	CTC TCT ACA TCC ATA GTC CC	

Die PCR-Reaktion wurde wie folgt angesetzt und die Amplifikation erfolgte nach dem nachstehenden PCR-Programm mittels Primus 25 advanced Thermocycler (PeQLab, Erlangen, Deutschland).

Tabelle 5: PCR-Ansatz zur Genotypisierung

Reagenz	Volumen
genomische DNA	4 µl
AmpliTaQ Gold Polymerase (5 U/µl)	0,375 µl
PCR-Puffer II	2,5 µl
MgCl₂ (25 mM)	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
M3A3-Primer	0,25 µl
M3B	0,375 µl
M3NEO9	0,25 µl
Aqua inj.	15,125 µl

Tabelle 6: PCR-Programm zur Genotypisierung

Phase	Temp	Zeit	Zyklen
	95 °C	15 min	1
Denaturierung	94 °C	45 Sekunden (sec)	
Hybridisierung	60 °C	60 sec	35
Elongation	72 °C	60 sec	
	72 °C	10 min	1

Agarosegelelektrophorese

Für die Größenauftrennung der PCR-Produkte wurde ein Gel, bestehend aus 2% Agarose in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris pH 8,0, 20 mM Essigsäure, 10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)) hergestellt.

Die Proben wurden 1:4 mit Ladungspuffer (60% (v/v) Glycerol, 1 M Tris Puffer (pH 8,0) 0,06% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und zusammen mit dem Größenmarker (100 bp DNA ladder) auf das in einem Becken mit 1x TAE-Puffer liegende Gel aufgetragen.

Mit Hilfe des Standard Power Pack P 25 (Biometra, Göttingen, Deutschland) wurde ein elektrisches Feld mit einer Spannung von 100 Volt an das Becken angelegt. Nach 1 Stunde (h) Laufzeit war die DNA weitreichend aufgetrennt und konnte nun gefärbt werden. Hierzu wurde das Gel für 20 min in eine abgedunkelte Lösung, bestehend aus 6 µl SYBR Green und 60 ml TAE-Puffer, gelegt.

Zur Darstellung der DNA-Banden wurde das Gel mit UV-Licht bestrahlt und mittels UV-Filter versehener Kamera im UV Solo Manual (Biometra) fotografiert.

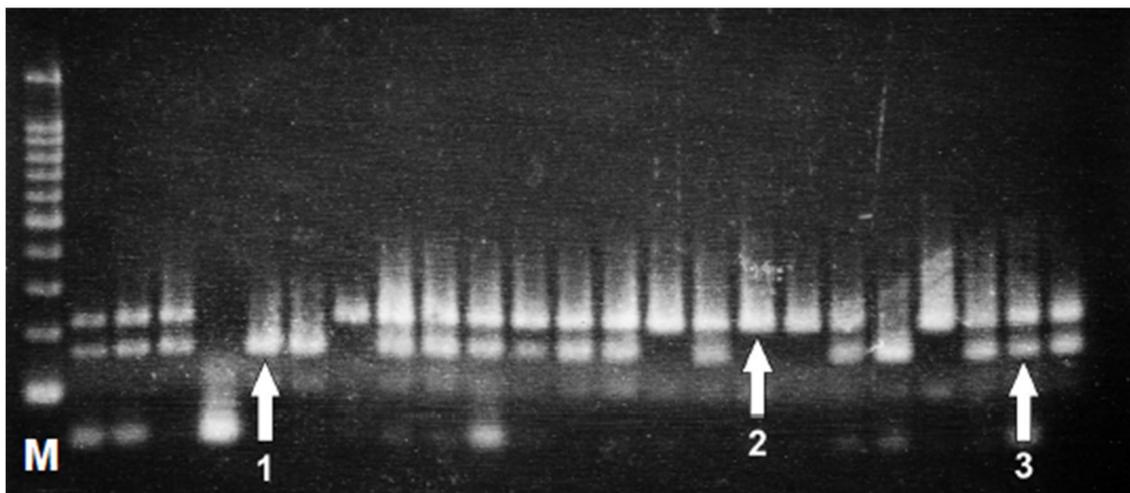


Abbildung 5: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten der M₃R-Genotypisierung.

Exemplarische Darstellung der Ergebnisse einer Genotypisierung. M: Marker (100 bp-Ladder), Pfeil 1: PCR-Produkt M3R-defizienter Mäuse (170 bp), Pfeil 2: PCR-Produkt WT-Mäuse (226 bp), Pfeil 3: PCR-Produkt heterozygoter Mäuse (226 bp und 170 bp).

3.2.2 Versuchsablauf und Probengewinnung

Insgesamt wurden 34 Mäuse für den Versuch der CAIA verwendet. Die genaue Anzahl der Mäuse nach Genotyp, Arthritis- (CAIA) und Kontrollgruppe (LPS) sowie weibliche und männliche Tiere ist aus Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Versuchstierverteilung

	WT-Mäuse		M ₃ R-defiziente Mäuse		Gesamt
	Männlich	Weiblich	Männlich	Weiblich	
LPS	5	2	5	2	14
CAIA	6	4	6	4	20
					34

In Abbildung 6 ist schematisch der Versuchsablauf von Tag 0 bis zum Versuchsende an Tag 10 dargestellt.

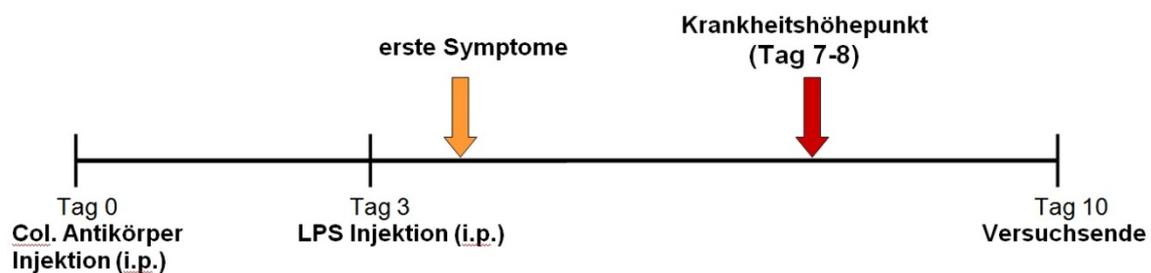


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der CAIA

Am Tag 0 des Versuchs wurde das Gewicht aller Tiere bestimmt und gewichtsabhängig der monoklonale Kollagen-Antikörper-Cocktail aus 5 Klonen (0,2 mg/g Körpergewicht (KG)) in sterilem PBS intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die Kontrolltiere erhielten eine i.p.-Injektion mit reinem PBS anstelle des Antikörper-Cocktails.

Am 3. Versuchstag erfolgte bei allen Tieren gewichtsabhängig (0,2 µg/gKG) die i.p.-Applikation von Lipopolysaccharid (LPS von E.Coli_{0111:B4}) in sterilem PBS, um den Krankheitsverlauf zu synchronisieren. Somit wurde der Krankheitshöhepunkt zwischen dem 7.-8. Tag erreicht. Bis zum Versuchsende wurde nun täglich, teilweise mehrfach, das Gewicht der Mäuse ermittelt und die Entstehung sowie der Verlauf arthritischer Symptome beobachtet und erfasst. Ab dem dritten Versuchstag erhielten alle Tiere als zusätzliches Futter das Diet Gel Recovery (Clear H₂O, Scanbur, Karlslunde, Dänemark) zur freien Verfügung, um einer erheblichen Gewichtsreduktion zuvorzukommen.

Für die Erhebung des Arthritis-Scores wurden alle vier Pfoten in Zehen, Mittelfuß und Fußwurzel unterteilt und unabhängig voneinander mit dem kumulativen Arthritis-Score

von 0 bis 3 bewertet (siehe Tabelle 8). Dabei wurde die Anzahl der betroffenen Zehen durch zwei geteilt und zu dem Punktwert der entsprechenden Pfote addiert.

Tabelle 8: Kumulativer Arthritis-Score (nach Irmeler et al. 2014)

Score Wert	Zehen	Mittelfuß	Fußwurzel
0	nicht geschwollen	normal	normal
1	geschwollen	Rötung & leichte Schwellung	Rötung & leichte Schwellung
2		stärkere Schwellung	stärkere Schwellung
3		starke Schwellung mit Ödem	starke Schwellung mit Ödem
Gesamt	maximal 9 Punkte (der Wert wird durch 2 geteilt)	maximal 12 Punkte	maximal 12 Punkte

Über den gesamten Versuch wurde zudem mindestens einmal täglich der Allgemeinzustand sowie das Spontanverhalten der Mäuse überprüft und zusammen mit den oben genannten versuchsspezifischen Kriterien und dem Gewicht als Belastungsscore dokumentiert (Tabelle 9).

Tabelle 9: Belastungsscore

Beobachtung	Parameter	Score
Körpergewicht (bezogen auf das Ausgangsgewicht)	Unbeeinflusst oder Anstieg	0
	Reduktion > 10%	10
	Reduktion > 20%	20
Allgemeinzustand	Fell glatt, glänzend und anliegend, Augen glänzend, Körperöffnungen sauber	0
	Fell matt, Augen trüb	5
	Fell stumpf, Augen eingesunken trüb, verklebte oder feuchte Körperöffnungen	10
	Fell gesträubt, Tier fühlt sich kalt an, Augen geschlossen, Krämpfe, Lähmungen, Atemgeräusche, bläuliche Schleimhäute	20
Spontanverhalten	Aufmerksam, neugierig, Aufrichten, flinke Bewegungen	0
	ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte oder Überaktivität, reduziertes Explorationsverhalten	5
	Isolation, Apathie, Koordinationsstörungen,	10

	ausgeprägte Stereotypien oder Hyperkinetik	
	Automutilation, Nekrosen, Rektumvorfall	20
Arthritis- bewertung	Kumulative Arthritisbewertung = 0	0
	Kumulative Arthritisbewertung = 1-14	5
	Kumulative Arthritisbewertung = 15-25	10
	Kumulative Arthritisbewertung = 26-33	20
Gesamtsumme aller 4 Kategorien		
Bewertung	Maßnahme	
keine Belastung	Es sind keine Maßnahmen erforderlich	0
geringe Belastung	2x tgl. Kontrolle, evtl. Futtergabe im Käfig, evtl. Umstellung auf weiches Zellstoffmaterial bei versuchsspezifischen Kriterien ≥ 5	5-9
mittelgradige Belastung	3x tgl. Kontrolle alle 8 h; Glucosegabe ins Trinkwasser, Versuchsleiter und Tierarzt informieren, 72 h andauernde mittelgradige Belastung gilt als hochgradige Belastung, DietGel Recovery Gabe, weiches Zellstoffmaterial, leicht erreichbare Tränkeflaschen	10-19
hochgradige Belastung	4x tgl. Kontrolle, subkutane Flüssigkeits- und Glucosegabe, Versuchsleiter und Tierschutzbeauftragte informieren – Beratung über weiteres Vorgehen, ggf. Euthanasie bei keiner sichtbaren Besserung innerhalb von Stunden	≥ 20
Abbruchkriterien	Gewichtsreduktion $>20\%$ über 3 Tage; Einzelscore von 20 bei Spontanverhalten oder Allgemeinzustand Arthritisbewertung ≥ 28 Punkte Bewegungsunfähigkeit; Infektion nach Hautverletzung	

Am 10. Versuchstag erfolgte die Euthanasie der Tiere mittels CO₂-Inhalationsnarkose und anschließender Brustkorberöffnung. Nach Tötung der Mäuse konnten die Proben präpariert und entnommen werden.

3.3 Histologische Standardfärbungen

Nach der Präparation wurden das linke Kniegelenk sowie die hintere linke und die vordere rechte Pfote direkt in 4% Paraformaldehyd (PFA)-Lösung in 0,1 M Natrium (Na)-Phosphatpuffer (pH 7,2 - 7,4) über 24 h bei 4°C fixiert.

Anschließend wurden die Proben sechs Mal mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer gespült und danach in Einbettungskapseln zum Entkalken für 10 Tage in 10% EDTA in 0,281 M Tris-Puffer gegeben. Nach der Entkalkung wurden die Präparate 1 h mit Leitungswasser (LW) gespült und im Anschluss in 0,1 M Na-Phosphatpuffer bei 4°C gelagert.

Die Paraffineinbettung erfolgte automatisch im Paraffin-Einbettautomaten (TP 1050, Leica, Wetzlar, Deutschland), hier wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% für 2 h, 80% für 2,3 h, 96% für 2 h und 3 x in 100% für je 3 h) dehydriert, daraufhin wurden die Proben dreifach mit Xylol inkubiert (1 x für 1 h, 2 x für 45 min) und dann in flüssiges Paraffin gegeben. Am nächsten Tag wurden die Proben an der Paraffinausgießstation (Leica) ausgeblockt und härteten aus.

Von den Paraffinblöcken wurden nun mit dem Mikrotom (Leica RM 2155, Leica) 5 µm dicke Schnitte angefertigt und jeweils zwei auf einen Objektträger aufgezogen und getrocknet.

3.3.1 HE-Färbung

Das Entparaffinieren erfolgte durch Einbringen der Objektträger für je 2 x 5 min in Xylol und dem sich anschließenden Durchlaufen einer absteigenden Alkoholreihe (100%; 96%, 80%, 70% für je 5 min). Daraufhin wurden die Proben für 5 min in destilliertem Wasser (Aqua dest) hydriert.

Die Kernfärbung erfolgte in filtrierter Mayers Hämalaunlösung für 10 min. Im Anschluss wurden die Präparate mit Aqua dest gespült, 10 min mit LW gebläut, erneut mit Aqua dest gespült und zur Bindegewebsfärbung in 1% Eosinlösung für 1 min überführt.

Nach abermaligem Abspülen mit Aqua dest folgte die Dehydrierung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100% für je 5 min) und 2 x 5 min Inkubation in Xylol. Final wurden die Schnitte mit Hilfe von DePeX und einem Deckglas dauerhaft eingedeckt.

3.3.2 Alcianblau-PAS-Hämatoxylin-Färbung

Die Entparaffinierung erfolgt wie unter 3.3.1 beschrieben, wobei hier das 80%ige Ethanol in der absteigenden Alkoholreihe entfiel. Danach wurden die Objektträger für 3 min in 3% Essigsäure umgesetzt und anschließend für 30 min in der Alcianblaulösung inkubiert. Nach 2 min Spülen mit Aqua dest kamen die Proben für 10 min in 1% Perjodsäure, woraufhin sie für 3 x 5 min mit Aqua dest gespült wurden. Daraufhin wurde für 13 min die abgedunkelte Inkubation mit dem Schiffschens Reagenz durchgeführt. Es folgte erneutes Spülen mit Aqua dest, 15 min Spülen mit LW und Spülen mit Aqua dest. Für die Kernfärbung wurden die Schnitte für 1 min in gefilterter Hämatoxylinlösung inkubiert und anschließend für 10 min unter fließendem LW gebläut. Nach Dehydrierung über eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100% für je 5 min) und 2 x 5 min in Xylol wurden die Proben mit Hilfe von DePeX eingedeckt.

3.3.3 Toluidinblau-Färbung

Das Entparaffinieren der Proben erfolgte wie unter 3.3.2 beschrieben. Daraufhin wurden die Objektträger für 1 min in die Toluidinblau-Lösung überführt und hiernach mit Aqua dest abgespült, um dann wie unter 3.3.2 dehydriert und eingedeckt zu werden.

3.4 Enzymnachweis

Für die Enzymnachweisverfahren fanden ebenfalls in Paraffin eingebettete Proben Verwendung, welche wie unter 3.3 erläutert hergestellt wurden.

Das Entparaffinieren erfolgte wie unter 3.3.2 beschrieben, die weiteren Verfahrensschritte werden in den folgenden Punkten erläutert.

3.4.1 Alkalische Phosphatase (ALP)

Nach dem Entparaffinieren wurden die Proben mit 0,1 M Tris-NaCl-Puffer (pH 9,4) für 10 min gespült. Die Färbung der alkalischen Phosphatase erfolgte über ihr Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP) mit Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) für 120 min bei 37°C.

Nach dreimaligem Spülen mit Aqua dest folgte die Gegenfärbung für 10 min mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat. Nun wurden die Proben erneut dreimal mit Aqua dest

gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100% für je 5 min) sowie 2 x 5 min in Xylol entwässert und anschließend mit Eukitt eingedeckt.

3.4.2 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)

Die entparaffinierten Proben wurden für 10 min mit einem 0,1 M Na-Acetat-Puffer (pH 5,2) gespült und dann mit 35 mg Naphthol-AS-TR-Phosphat, 35 mg Echtrotsalz, 125 µl N-N-Dimethylformamid sowie 57,5 mg Na-Tartrat gelöst in 25 ml 0,1 M Na-Acetat-Puffer (pH 5,2) für 45 min bei 37°C gefärbt.

Nach dreifachem Spülen mit Aqua dest erfolgte die Gegenfärbung mittels filtrierter Hämatoxylinlösung für 1 min. Nachdem die Proben 10 min unter fließendem LW bläuten, wurden sie mit Aqua dest gespült und anschließend mit Kaisers Glycingelatine eingedeckt.

3.5 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Verfahren wurden gleichfalls in Paraffin eingebettete Proben verwendet, die wie unter 3.3 beschrieben aufbereitet wurden.

Die Entparaffinierung wurde bei den drei hier folgenden Verfahren nach dem gleichen Schema durchgeführt.

Die Proben wurden für 2 x 5 min in Xylol überführt, anschließend für 10 min in technischem Aceton und für 10 min in einem Gemisch aus 50% technischem Aceton und 50% Waschpuffer ((WP) bestehend aus TBS und 0,025% Triton-X-100) inkubiert. Daraufhin wurden sie für 2 x 5 min mit WP gespült und standen dann für die weiteren verfahrensspezifischen Schritte zur Verfügung.

Auf den Objektträgern befanden sich jeweils zwei Proben, was es ermöglichte, immer eine Negativkontrolle (Antibody diluent ohne jeweiligen Primärantikörper) anzulegen.

3.5.1 Kollagen II

Die entparaffinierten Proben mussten für den Kollagen II-Nachweis vorbehandelt werden. Hierfür wurden die Schnitte für 45 min bei 37°C mit 0,2% Hyaluronidase in TBS (pH 7,4) inkubiert. Dann wurden die Objektträger 2 x 5 min mit WP gespült, die endogene Peroxidase für 5 min bei RT mit H₂O₂ blockiert und erneut für 2 x 5 min mit WP gespült.

Daraufhin erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers für Kollagen II (1:3000) über Nacht bei 4°C.

Die Proben wurden für 3 x 5 min mit WP gespült und der biotinylierte sekundäre Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:500 für 30 min bei RT aufgetragen. Hier wurde der Antikörper mit Mausserum im Verhältnis 1:8 und 1% BSA in TBS verdünnt. Hiernach wurden die Proben erneut 2 x 5 min mit WP gespült.

Der Nachweis erfolgte über die Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode, wobei das Vectastain Elite ABC-Kit Verwendung fand. Hier wurden nach Herstellerangaben 30 min vor Nutzung 1 Tropfen (entspricht 45 µl) des Reagenzes A mit 1 Tropfen des Reagenzes B und 2,5 ml TBS gemischt. Die Lösung wurde auf die Proben aufgetragen und konnte für 30 min bei RT einwirken.

Dann wurden die Objektträger für 2 x 5 min mit WP und 1 x 5 min mit Aqua dest gespült, um nun mit dem Substratchromogen für 5 min bei RT inkubiert zu werden. Als Substratchromogen wurde das Nova Red Substrat-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden darauf für 4 x 5 min mit Aqua dest gespült und dann mit Hämatoxylin 1 min gegengefärbt. Nach 10 min spülen mit LW wurden die Proben für je 5 min einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und für 2 x 5 min Xylol zugeführt. Die Präparate wurden mit DePex eingedeckt.

3.5.2 Alpha smooth muscle actin (ASMA)

Nach der Entparaffinierung wurden die Proben 2 x 5 min mit WP gespült und daraufhin mit dem primären Antikörper in einem Verdünnungsverhältnis von 1:100 benetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Proben wurden am nächsten Tag gespült und der sekundäre Antikörper aufgetragen. Der Nachweis mit ABC-Vectastain und Nova Red sowie die Gegenfärbung mit Hämatoxylin, die Dehydrierung und die Eindeckung der Präparate folgten dem gleichen Ablauf wie unter 3.5.1 beschrieben.

3.6 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur besseren Beurteilung der Ultrastruktur von Knorpel-, Knochen- und SM-Bereichen wurde die elektronenmikroskopische Untersuchung gewählt. Hierbei fand jeweils die Hälfte der rechten Kniegelenke Verwendung.

Die Proben wurden nach der Präparation mit Yellow-Fix (2% PFA in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,2-7,4 mit 0,02% Pikrinsäure und 2% Glutaraldehyd) über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 6-fach mit 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,2–7,4) gewaschen, bis die Gelbfärbung der Pikrinsäure nicht mehr sichtbar war.

Nun konnte die Epon-Einbettung erfolgen. Die Proben wurden für 2 h in 1% Osmiumtetroxid (OsO_4) in 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,2–7,4) nachfixiert. Nach erneutem 6-fachem Spülen mit 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,2–7,4) wurden sie in eine aufsteigende Alkoholreihe zum Dehydrieren überführt und über Nacht bei -600 mbar in einem Exikator inkubiert.

Anschließend wurden die Proben 3 x (1 x 20 min und 2 x 30 min) mit Xylol gewaschen und daraufhin in ein täglich wechselndes Epon-Xylol-Gemisch gegeben. Das Mischverhältnis war aufsteigend gewählt, sodass die Proben bereits am sechsten Tag in reinem Epon inkubierten. In diesem Zeitraum wurden die Proben jeweils über Nacht bei -600 mbar in dem Exikator inkubiert. Am siebten Tag erfolgte die Ausbettung der Proben.

Mittels Ultramikrotom (Reichert-Ultracut, Leica) erfolgte die Herstellung von 0,5-1 μm dicken Semidünnschnitten, welche mit Safranin-O und Toluidinblau gefärbt wurden. Auf diesen Schnitten wurden mit dem Lichtmikroskop aussagekräftige Bereiche lokalisiert, von welchen dann 60-80 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt wurden. Diese wurden auf Kupfergitter gezogen und mit Bleicitrat sowie Uranylacetat kontrastiert. Die Beurteilung dieser Schnitte erfolgte durch das Transmissionselektronenmikroskop (LEO EM 912, LEO Electron Microscopy Ltd, Cambridge, England). Digitale Bilder konnten mit Hilfe eines Kameraaufsatzes (Slow-Scan CCD-Camera for TEM, Olympus, Münster, Deutschland) aufgenommen werden.

3.7 Auswertung der histologischen Verfahren

Alle histologischen Schnitte wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Axiophot-2, Zeiss, Jena, Deutschland) in unterschiedlichen Vergrößerungen (25er-, 50er-, 100er-, 200er-, 400er- und teilweise 1000er-Vergrößerung) gesichtet und über eine am Mikroskop angebrachte Kamera (Leica DC 500, Leica) digital dokumentiert.

3.7.1 Auswertung histologischer Standardfärbungen

Zur Beurteilung der Präparate wurden diese mittels Lichtmikroskop gesichtet. Hierbei fiel auf, dass die Pfoten kaum einheitliche Schnittachsen aufwiesen. Die einzelnen Gelenke waren in unterschiedlichen Präparaten selten wiederzufinden und somit waren diese Präparate nicht für einen Vergleich unter den Gruppen zu nutzen. Allerdings wurden für alle Färbungen exemplarisch einige Pfotenpräparate aus jeder Gruppe mit gefärbt und auch gesichtet.

Die Kniegelenke hingegen zeigten eine einheitliche Schnittführung und konnten somit untereinander einem Vergleich dienen. Hierbei wurden nur Kniegelenke von Tieren mit einem Wert ≥ 4 im kumulativen Arthritis-Score beachtet.

Um pathologische Veränderungen in den Bereichen Knorpel, Knochen und SM aufzuzeigen, wurde ein Score für die Kniegelenke erstellt (Tabelle 10), wobei die HE-gefärbten Präparate hauptsächlich der Beurteilung der SM dienten, die Alcianblau-PAS-Hämatoxylin und die Toluidinblau-gefärbten Präparate der Knorpel- und Knochenbeurteilung. Die Vergabe der Score-Werte erfolgte verblindet.

Tabelle 10: Histologischer Score zur Beurteilung der Kniegelenke

Score-Wert	Synovialmembran	Knorpel	Knochen
0	keine Veränderung	keine Veränderung	keine Veränderung
1	mehr als 2 Zellschichten dick, kaum Zellinvasion, Gefäße normal	Knorpeloberfläche zu kleinen Teilen erodiert	Knochenumbau nur am Ansatz der Gelenkkapsel, geringe Tiefe
2	mehr als 5 Zellschichten dick, verstärkte Zellinvasion, evtl. Pannusbildung, Gefäße normal	Knorpeloberfläche erodiert, zum Teil Knorpeldestruktion	Knochenbeteiligung von Gelenkkapsel Richtung Zentrum des Gelenks, Tiefe bis Epiphysenfuge
3	wie 2 + Pannusbildung, Gefäße zum Teil vermehrt	wie 2 + Knorpel bindegewebig überzogen	wie 2 + Knochenverlust

3.7.2 Auswertung der Enzymnachweise

Für die Auswertung der Enzymnachweise wurden die TRAP-positiven, mehrkernigen Zellen am Lichtmikroskop ausgezählt und die ALP-gefärbten gesichtet.

3.7.3 Auswertung der Immunhistochemie

ASMA-Auswertung

Im Rahmen der ASMA-Beurteilung wurde erneut ein Score erstellt (siehe Tabelle 11) und die Präparate am Lichtmikroskop beurteilt.

Tabelle 11: Histologischer Score zur Quantifizierung ASMA-gefärbter Schnitte

Score-Wert	Morphologie
0	wenige Gefäßanschnitte, keine verdickten Gefäßanschnitte
1	wenige Gefäßanschnitte, kaum verdickte Gefäßanschnitte
2	vermehrt Gefäßanschnitte, gesteigerte Anzahl von verdickten Gefäßanschnitten (weniger als 50%)
3	viele Gefäßanschnitte, die meisten hiervon verdickt

Kollagen II-Auswertung

Für die Auswertung der Kollagen II-Färbung wurden Bilder am Lichtmikroskop in 50-facher Vergrößerung aufgenommen und im Adobe Photoshop CS5 (Adobe, San Jose, CA, USA) mit einem Messstrich versehen und dieser kalibriert.

Die sich im Gelenkspalt befindlichen Knorpelanschnitte wurden daraufhin mit Hilfe des Image Pro Premier (Version 9.1, Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA) auf ihre Länge vermessen und Bereiche ohne Kollagen II-Färbung quantifiziert.

Dabei wurde je die Länge des Kollagen II-positiven Knorpels im Gelenkspalt von Femur und Tibia gemessen. Anteile, welche Kollagen II-negativ waren, wurden ebenfalls vermessen und mit den Kollagen II-positiven Anteilen prozentual ins Verhältnis gesetzt.

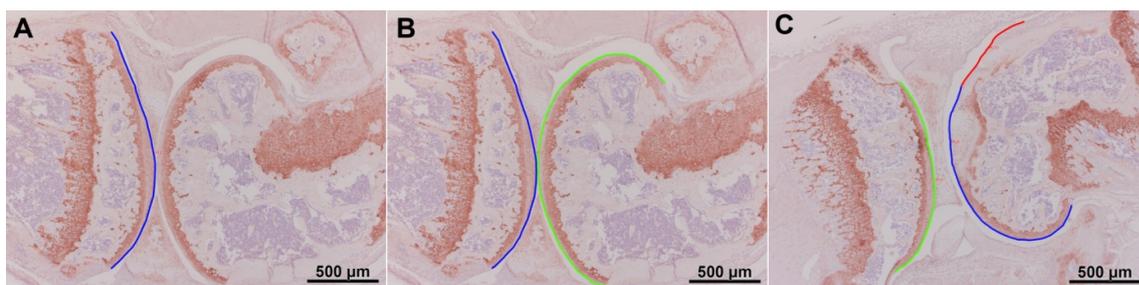


Abbildung 7: Knorpellängenmessung

Immunohistochemischer Kollagen II-Nachweis, Kniegelenk

A: WT-CAIA, blau markiert der Kollagen II-positiv Bereich der Tibia

B: WT-CAIA, blau wie in A, grün markiert der Kollagen II-positiv Bereich am Femur

C: M3R^{-/-}-CAIA, blau und grün markieren Kollagen II-positiv Bereiche, rot markiert den Kollagen II-negativ Bereich hier am Femur

3.8 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung fanden der Kruskal-Wallis-Test und der Mann-Whitney-U-Test Verwendung. Die Daten wurden mit Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Als signifikant wurden Unterschiede mit einem p-Wert $\leq 0,05$ erachtet. GraphPad Prism (Version 6.0, GraphPad Prism, La Jolla, CA, USA) diente als statistisches Computerprogramm.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Daten

Die klinischen Daten wurden im Verlauf der insgesamt 11 Versuchstage erhoben. Wie unter 2.2.2 beschrieben wurden das Körpergewicht, das Verhalten und das Erscheinungsbild der einzelnen Tiere im Rahmen des Belastungsscores (Tabelle 9) und die Ausprägung der arthritischen Symptomatik mit dem kumulativen Arthritis-Score (Summe der Arthritis-Scores (Tabelle 8) aller Pfoten eines Tieres) beobachtet, eingeschätzt und dokumentiert.

Ausprägung von Arthritissymptomen und CAIA-Inzidenz

Es wurden sowohl männliche als auch weibliche WT- und M₃R-defiziente Mäuse für den Versuch verwendet. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die männlichen Mäuse stärkere arthritische Symptome über den größten Teil des Versuchsablaufs aufwiesen als die Weibchen ihrer entsprechenden Gruppe (Abbildung 8). Darüber hinaus zeigten die Männchen beider Gruppen auch eine erhöhte Inzidenz (Mäuse wurden als arthritisch betrachtet, wenn der kumulative Arthritis-Score ≥ 4 war) der Arthritissymptome im Vergleich zu den Weibchen der gleichen Gruppe (Abbildung 9).

Am sechsten Tag zeigten weibliche wie auch männliche M₃R-defiziente Mäuse eine höhere Inzidenz der Arthritis als die WT-Mäuse. Bei den M₃R-defizienten Männchen betrug sie 66%, wohingegen die WT-Männchen nur eine 50%ige Inzidenz aufwiesen. Bei den Weibchen war die Inzidenz im Gesamten deutlich niedriger und auch hier zeigten M₃R-defiziente Weibchen am sechsten Tag eine erhöhte Inzidenz (20%) gegenüber WT-Weibchen (0%).

Bei den weiblichen Tieren war ab dem siebten Tag kein weiterer Unterschied in der Inzidenz zu beobachten. Bei den männlichen Mäusen bestand auch am letzten Tag des Experiments eine Inzidenzdifferenz von 14% (M₃R-defizienten Männchen: 80%, WT-Männchen: 66%).

Auch gab es Unterschiede bezüglich des Zeitpunkts, an dem die Arthritissymptome den kritischen Score-Wert überschritten. Die männlichen Tiere beider Gruppen zeigten bereits am vierten Tag, einen Tag nach der LPS-Gabe, die Krankheitsinduktion.

Bei den M₃R-defizienten Weibchen trat dies am sechsten Tag und bei den WT-Weibchen erst am siebten Tag auf.

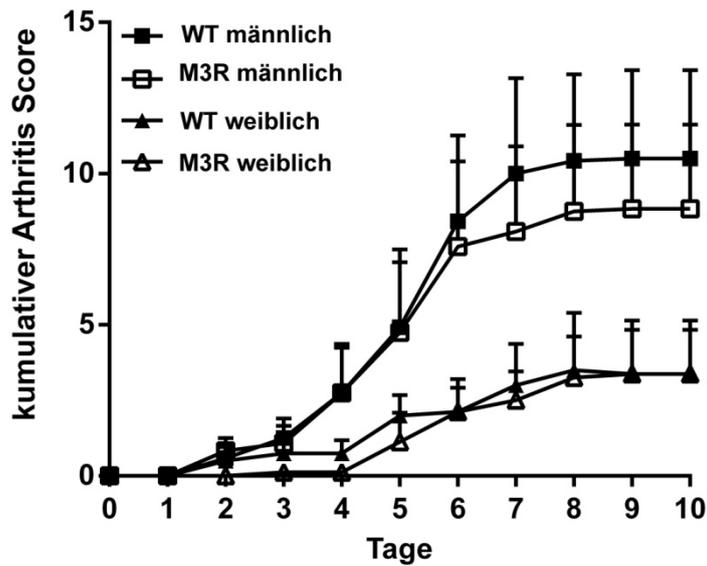


Abbildung 8: Kumulativer Arthritis-Score im Versuchsverlauf

Dargestellt ist der Mittelwert des kumulativen Arthritis-Scores \pm SEM von allen männlichen (jeweils $n = 6$) und weiblichen (jeweils $n = 4$) WT- und M3R^{-/-}-Mäusen der CAIA-Gruppe. Aus Beckmann et al. 2016

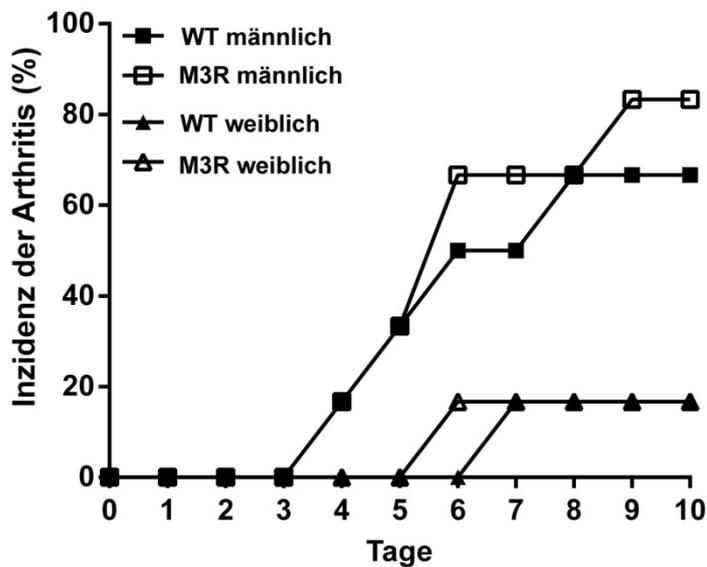


Abbildung 9: Inzidenz der Arthritis im Versuchsverlauf

Dargestellt als prozentualer Anteil der männlichen und weiblichen WT- und M3R^{-/-}-Mäuse der CAIA-Gruppe mit einem kumulativen Arthritis-Score ≥ 4 . Aus Beckmann et al. 2016

Belastungsscore im Verlauf

Im Allgemeinen waren die physischen Reaktionen der M₃R-defizienten Mäuse auf die Arthritisinduktion und LPS-Injektion stärker als die der WT-Mäuse (Abbildung 11).

Dies wurde vor allem an Tag vier besonders deutlich. Die M₃R-defizienten CAIA-Mäuse (M3R^{-/-}-CAIA) hatten einen deutlich höheren Wert im Belastungsscore als die WT-CAIA-Mäuse. Der Unterschied war mit einem p-Wert von < 0,01 statistisch signifikant. Ebenfalls hatten die M₃R-defizienten Kontrolltiere (M3R^{-/-}-LPS) mit einem p-Wert von < 0,05 am vierten Versuchstag einen signifikant höheren Wert im Belastungsscore als die Kontrolltiere der WT (WT-LPS)-Gruppe.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die WT-CAIA-Tiere am sechsten Tag einen deutlich höheren Belastungsscore-Wert hatten als ihre entsprechenden Kontrolltiere. Auch hier war der p-Wert für diesen Zusammenhang < 0,05. Für die M₃R-defizienten CAIA-Mäuse und ihre Kontrollgruppe bestand dieser Zusammenhang ab Tag vier nahezu über den gesamten Versuchsverlauf.

Als Teil des Belastungsscores fungierte auch die Gewichtsreduktion in Bezug auf das Ausgangsgewicht (Tabelle 9). Auch hier war der Gewichtsverlust der M₃R-defizienten CAIA-Mäuse in Bezug zu ihrer Kontrollgruppe signifikant erhöht (p = 0,035), ebenso zu den WT-CAIA-Mäusen p = 0,035, welche keine signifikante Beeinträchtigung gegenüber ihrer Kontrollgruppe zeigten (Abbildung 10).

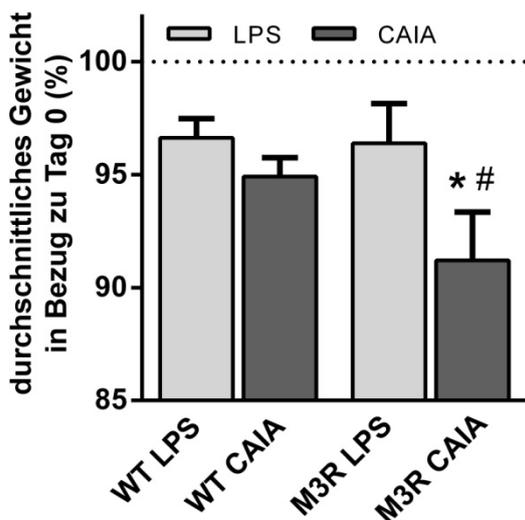


Abbildung 10: Gewichtsveränderungen der Mäuse über den gesamten Versuchsverlauf

Die Gewichtsabnahme in Bezug zum Ausgangsgewicht (Tag 0) wurde für jede Gruppe als Durchschnittsprozentatz ± SEM angegeben. (*: p < 0,05: CAIA im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe, #: p < 0,05: M3R^{-/-}-CAIA im Vergleich zu WT-CAIA) Aus Beckmann et al. 2016

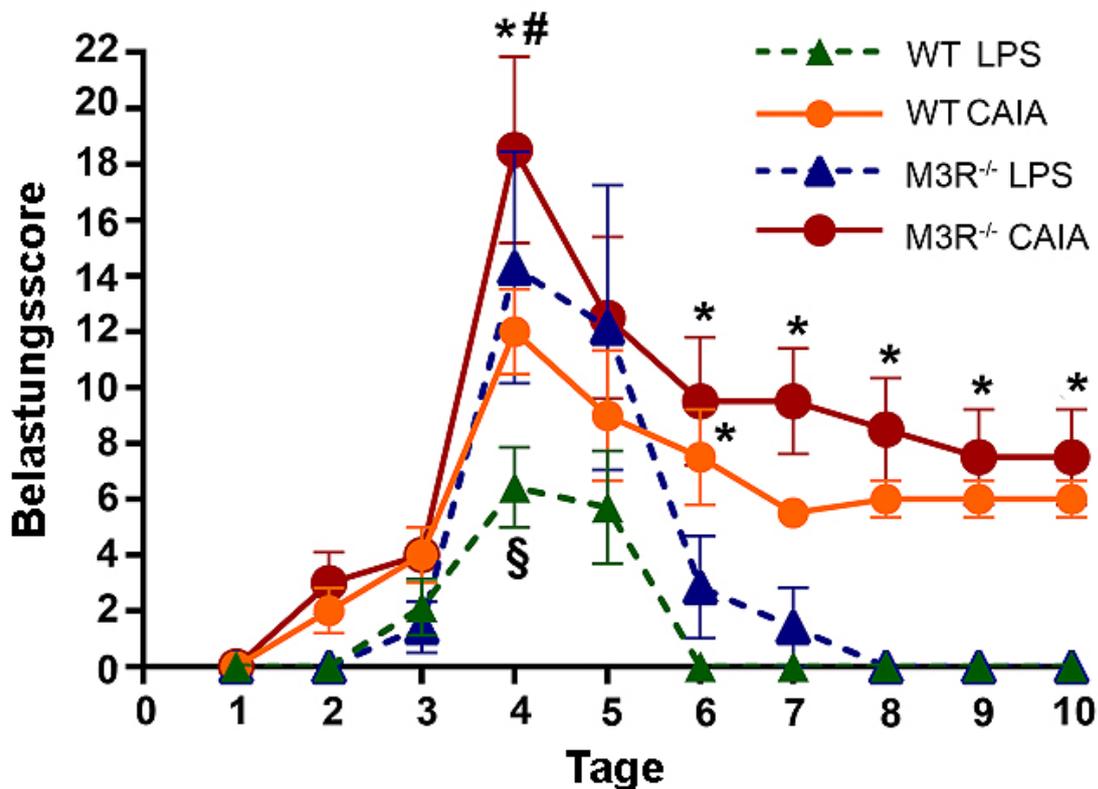


Abbildung 11: Belastungsscore im Versuchsverlauf

Der Belastungsscore wurde bei allen Tieren an jedem Versuchstag bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. (*: $p < 0,05$: CAIA im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe, #: $p < 0,05$: M3R^{-/-}-CAIA im Vergleich zu WT-CAIA, §: $P < 0,05$: M3R^{-/-}-LPS im Vergleich zu WT-LPS) Aus Beckmann et al. 2016

Generell zeigten M₃R-defiziente Mäuse bei leicht erhöhter Arthritisinzidenz eine stärkere physische Belastung als WT-Mäuse sowie einen erhöhten Gewichtsverlust über den Versuchsverlauf.

4.2 Histopathologische Veränderung der Synovialmembran

Für die Beurteilung der SM wurden die HE-gefärbten Präparate verwendet sowie die Ultradünnschnitte für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastruktur. Für die Auswertung der Blutgefäße im Bereich der SM wurde zusätzlich noch die immunhistologische Darstellung mit einem polyklonalen Antikörper gegen die Alpha-Isoenzym-Variante des Aktins in den glatten Muskelzellen gewählt.

HE-Färbung Kniegelenk

Bei dieser Färbung fungiert das positiv geladene Hämalaun als Kernfarbstoff, indem es über die Anlagerung an negativ geladene Phosphatgruppen der DNA den Zellkern blau färbt. Als zweite Komponente färbt das saure Eosin basische extra- wie auch intrazelluläre Strukturen rot, wie zum Beispiel Kollagenfasern, elastische Fasern und das Zytoplasma (Schmitz et al. 2010; Mulisch and Welsch 2015).

Zur Auswertung wurden die Präparate verblindet und dann am Lichtmikroskop durch die Vergabe eines Scores bewertet (siehe Tabelle 10). Hierbei wurde die Dicke der SM, das Vorliegen von Gefäßanschnitten, die Zellinvasion in die SM und eine mögliche Pannusbildung beurteilt. Für die Quantifizierung wurden nur inzidente Tiere berücksichtigt, das bedeutet Tiere mit einem kumulativen Arthritis-Score ≥ 4 .

Zwischen den Kniegelenken der CAIA-Tiere und den LPS-Kontrolltieren konnten deutliche Unterschiede festgestellt werden. Bei den Kontrolltieren beider Gruppen (M_3R -defiziente und WT-Mäuse) konnte die aus ein bis zwei Zellschichten bestehende synoviale Intima, welche sich in den Präparaten an den lateralen Rändern jeweils zwischen Femur und Tibia darstellte, beurteilt werden (Pfeil in Abbildung 13 A). Unter der Intima lag die Subintima, welche lockeres Bindegewebe, kleine Blutgefäße und an einigen Stellen auch Fettgewebe enthielt (Stern in Abbildung 13 A).

In diesen Präparaten erschien die SM gut abgrenzbar und nicht von Zellen infiltriert. Ebenso war die Subintima dominiert von siegelringförmigen Fettzellen ohne zusätzliche Zellinvasion.

Bei den CAIA-Tieren beider Gruppen war die SM deutlich um einige Zellschichten verdickt (Pfeil in Abbildung 13 B und C), es konnte zum Teil eine massive Zellinvasion, insbesondere in der Subintima beobachtet werden (Stern in Abbildung 13 B und C). Des Weiteren infiltrierte und destruierte ein von der SM ausgehendes Gewebe die im Gelenkspalt lateral gelegenen Knorpelflächen sowie teilweise die darunterliegenden Knochenbereiche und bildete einen sogenannten Pannus (Stern in Abbildung 15 C und D). Ebenfalls waren in den Präparaten der CAIA-Tiere vermehrt Gefäßanschnitte darstellbar, deren Gefäßwände im Vergleich zu denen der Kontrolltiere verdickt wirkten (G in Abbildung 13 B).

In den Präparaten der CAIA-Mäuse zeigte sich ein unstrukturierteres Bild, in welchem die Gewebegrenzen aufgehoben waren, die synoviale Intima zum Teil massiv verdickt war und sich in der Subintima zwischen den Fettzellen eine Vielzahl von eingewanderten Zellen befand (Abbildung 13 B und C).

Allerdings war zwischen den M_3R -defizienten und den WT-CAIA-Mäusen kein statistisch signifikanter Unterschied im Bereich der pathologischen SM-Veränderungen auszumachen. Es konnte aber eine Tendenz zu stärkeren pathologischen

Veränderungen in M_3R -defizienten CAIA-Mäusen im Vergleich zu arthritischen WT-Mäusen beobachtet werden (Abbildung 14).

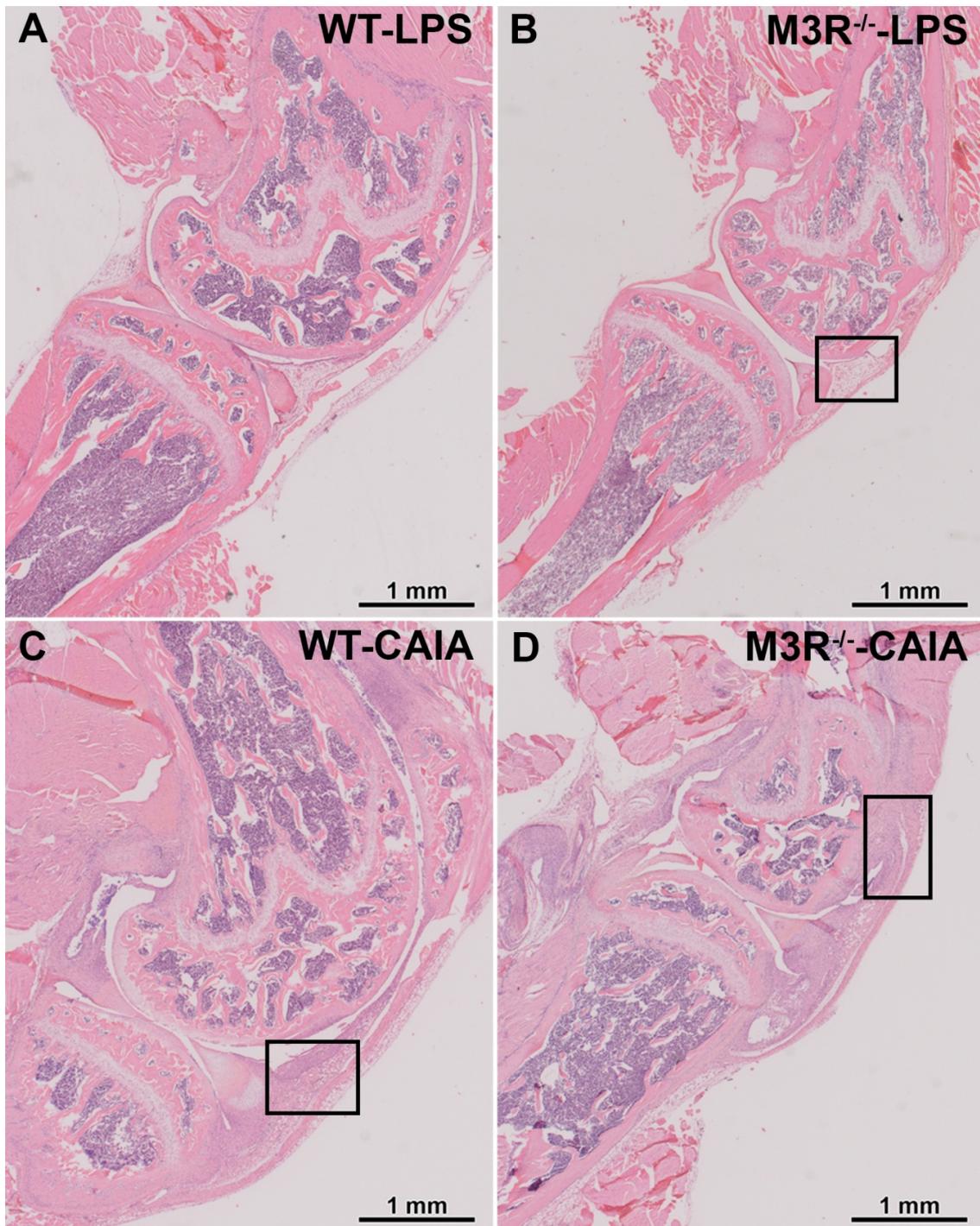


Abbildung 12: HE-Färbung, Kniegelenk, Übersicht

Übersichtsaufnahmen von Präparaten aus allen vier Versuchsgruppen zur Beurteilung der SM, die gerahmten Bildausschnitte sind in Abbildung 13 vergrößert dargestellt. Aus Beckmann et al. 2016

- A: WT-Kontrollmaus (WT-LPS)
- B: M_3R -defiziente Kontrollmaus ($M_3R^{-/-}$ -LPS)
- C: WT-CAIA-Maus (WT-CAIA)
- D: M_3R -defiziente CAIA-Maus ($M_3R^{-/-}$ -CAIA)

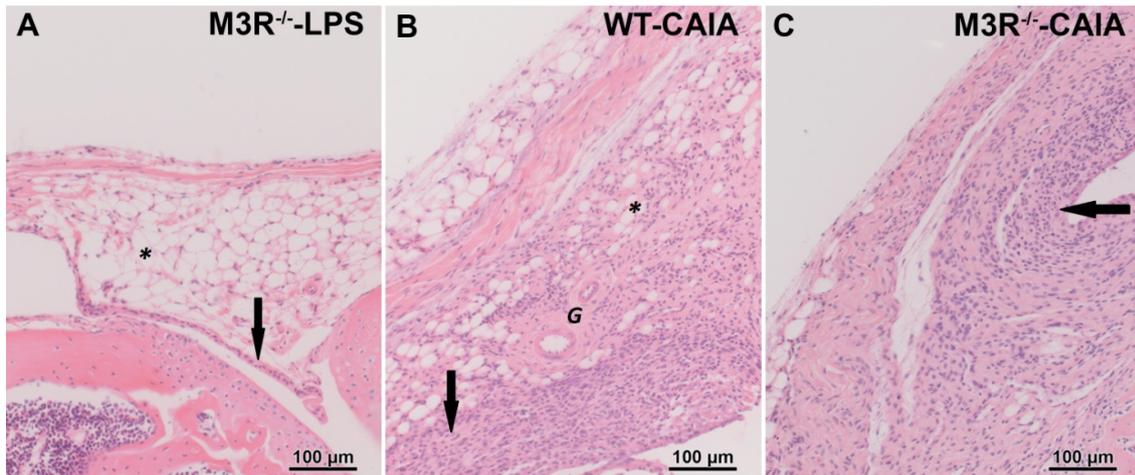


Abbildung 13: HE-Färbung, lateraler Kniegelenksspalt, Vergrößerung aus Abbildung 12

Aus Beckmann et al. 2016

A: Vergrößerung aus Abbildung 12 B, Kontrollmaus, synoviale Intima mit 1-2 Zellreihen (Pfeil), Subintima mit überwiegend Adipozyten und einem Gefäßanschnitt (*)

B: Vergrößerung aus Abbildung 12 C, WT-CAIA-Maus, deutlich verdickte synoviale Intima (Pfeil), starke Zellinvasion in der Subintima (*) und zwei Gefäßanschnitte (G)

C: Vergrößerung aus Abbildung 12 D, M3R^{-/-}-CAIA-Maus, mit verdickter synovialer Intima (Pfeil)

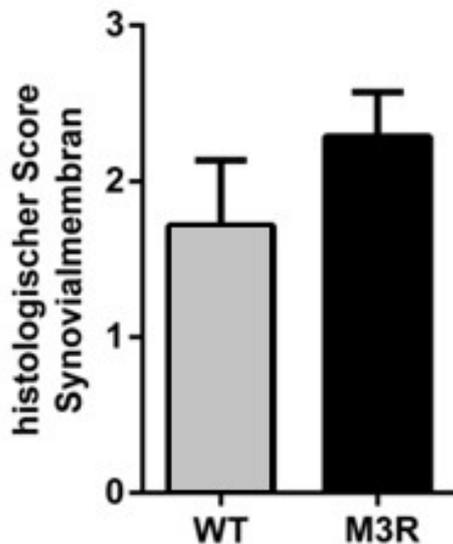


Abbildung 14: Quantifizierung der histopathologischen Veränderungen der SM im Kniegelenk

Dargestellt als Mittelwerte des histologischen Scores \pm SEM für Kniegelenke von arthritischen WT (n=7) und M3R^{-/-} (n=7)-Mäusen. Aus Beckmann et al. 2016

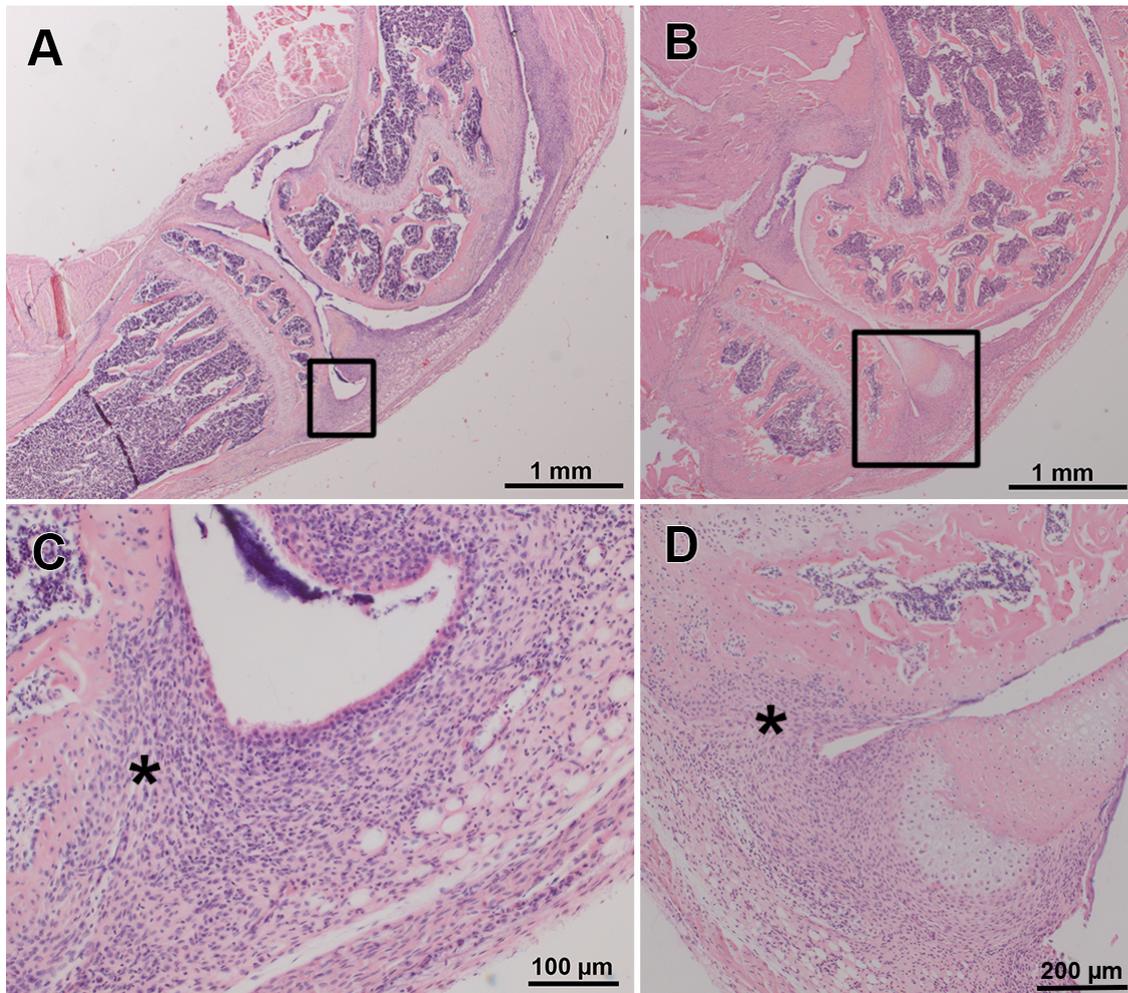


Abbildung 15: HE-Färbung, Kniegelenk, Pannus

A & B: Kniegelenkübersicht M3R^{-/-}-CAIA-Maus, gerahmte Areale sind in C und D vergrößert

C: Vergrößerung aus A, der Stern markiert das von der SM ausgehende, den Knochen infiltrierende Pannusgewebe im lateralen Bereich der Tibia

D: Vergrößerung aus B, auch hier ist eine Infiltration des Knochens und des Knorpels durch das Pannusgewebe zu beobachten und mit einem Stern markiert.

Veränderung der SM im Elektronenmikroskop

Zur näheren Betrachtung der Ultrastruktur der Synoviozyten der jeweiligen Gruppen wurden die Präparate der Kniegelenke elektronenmikroskopisch untersucht. Auch hier konnten in beiden Gruppen der CAIA-Tiere Veränderungen zu den Kontrollmäusen beobachtet werden. Bei den arthritischen Gelenkpräparaten waren sowohl die A-Zellen als auch die B-Zellen deutlich hypertrophiert. Die A-Zellen zeigten ein erhöhtes Vorkommen von Vakuolen (Pfeile in Abbildung 16 C und D). In den B-Zellen beider CAIA-Gruppen und den A-Zellen der M₃R-defizienten CAIA-Tiere lag zudem das endoplasmatische Retikulum vermehrt vor (Sterne in den Abbildung 16 D, Abbildung 17 C und D).

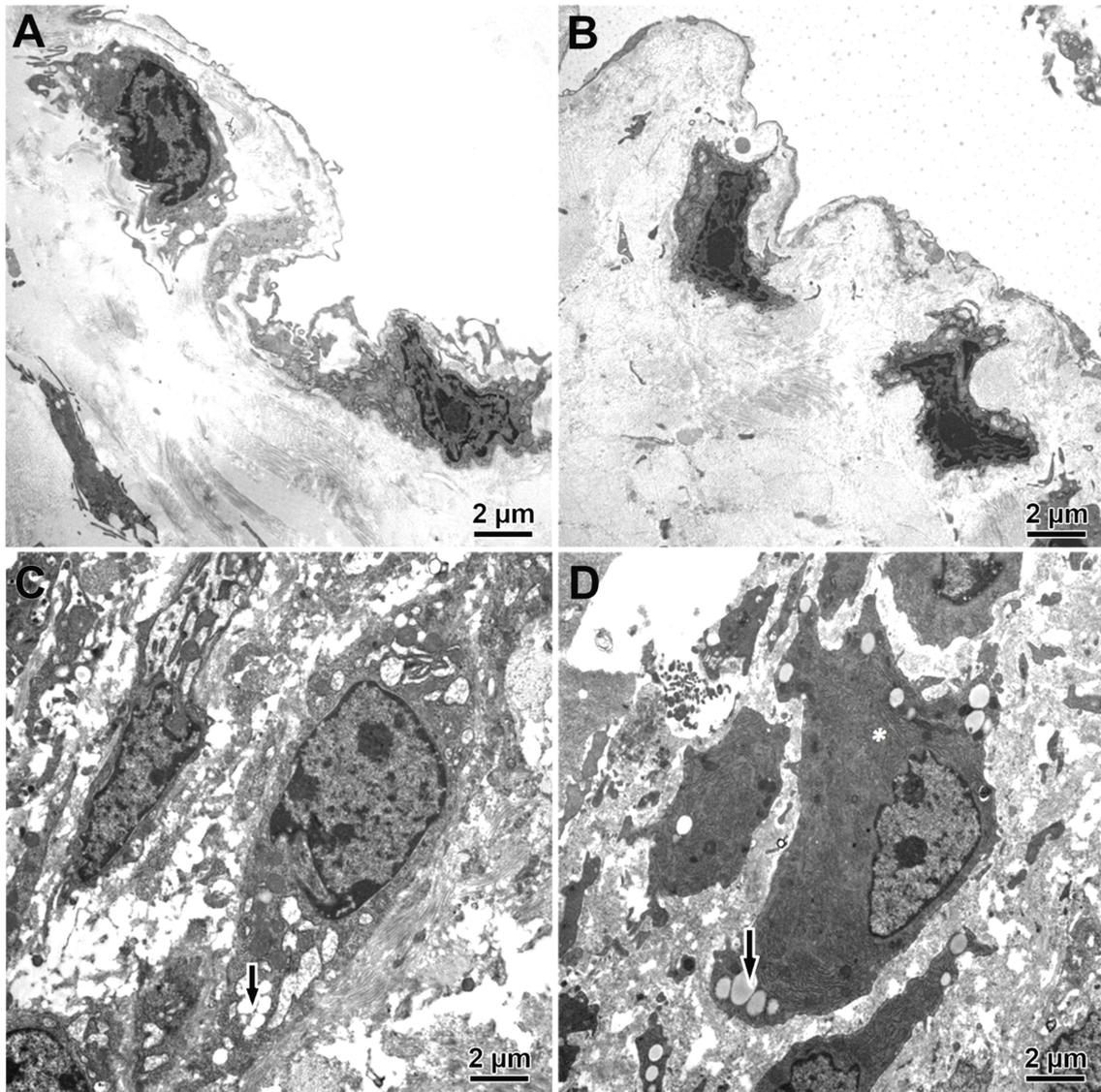


Abbildung 16: TEM synovialer Makrophagen (A-Zellen), Kniegelenk

Aus Beckmann et al. 2016

A: WT-LPS, A-Zelle mit physiologischem Erscheinungsbild

B: M3R^{-/-}-LPS, A-Zelle mit physiologischer Erscheinung

C: WT-CAIA, A-Zelle mit vermehrt Vakuolen (Pfeil)

D: M3R^{-/-}-CAIA, A-Zelle mit vermehrtem rauem endoplasmatischem Retikulum (rER, mit Stern markiert) und Vakuolen (Pfeil)

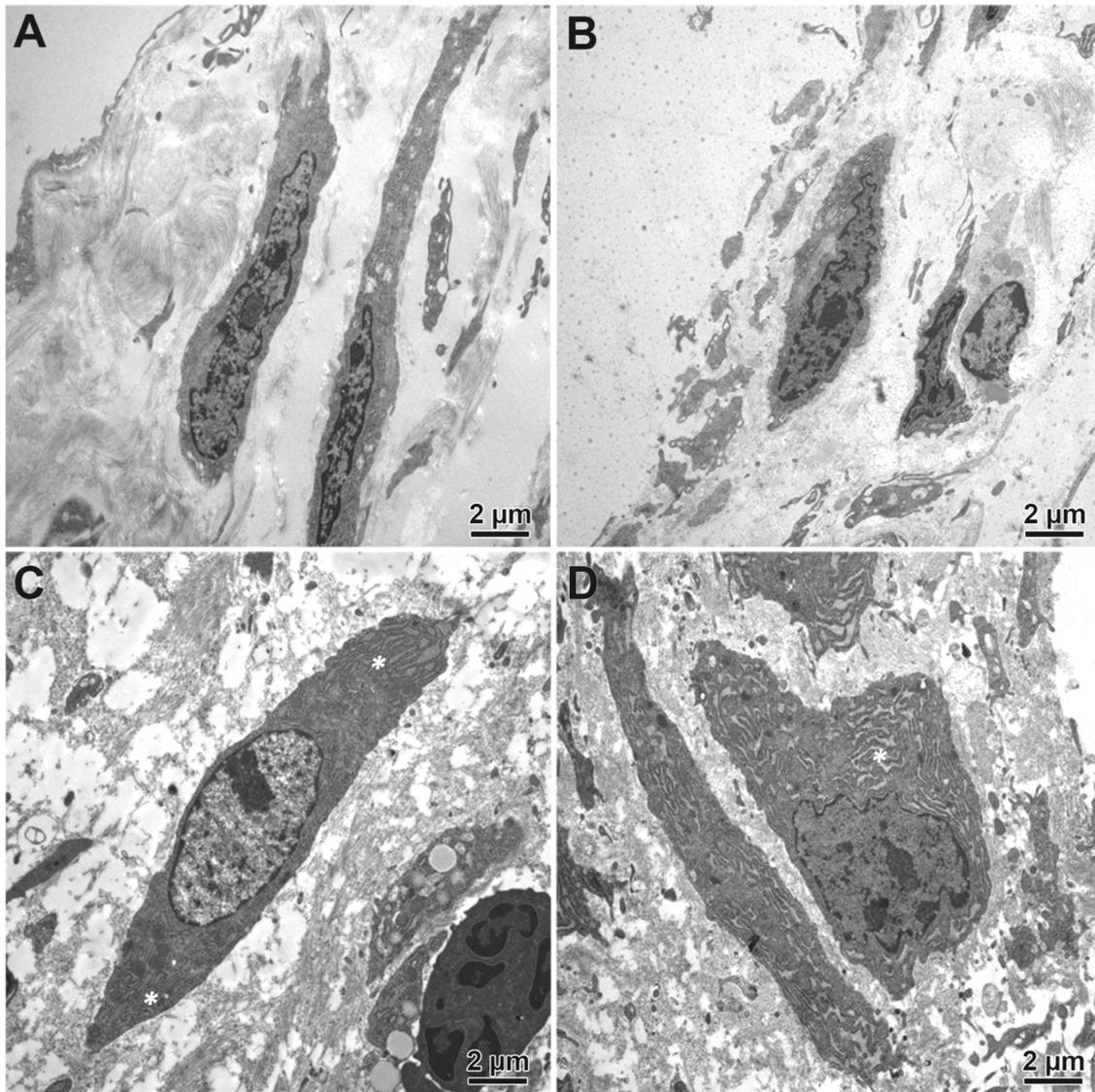


Abbildung 17: TEM synovialer Fibroblast (B-Zellen), Kniegelenk

Aus Beckmann et al. 2016

A: WT-LPS, B-Zelle mit physiologischem Erscheinungsbild

B: M3R^{-/-}-LPS, B-Zelle mit physiologischer Zellstruktur

C: WT-CAIA, B-Zelle mit vermehrt rER (Stern)

D: M3R^{-/-}-CAIA, B-Zelle, der Stern kennzeichnet vermehrtes rER

Veränderung der Blutgefäße

Die Beurteilung der Gefäße erfolgte an ebenfalls verblindeten ASMA-markierten Präparaten unter Vergabe eines Scores (Tabelle 11). Für die Quantifizierung wurden nur Mäuse mit einem kumulativen Arthritis-Score ≥ 4 gewertet.

Im Rahmen der Score-Vergabe wurde die Anzahl der Gefäßanschnitte und die Dicke der Gefäßwände erhoben. Hierbei stellten sich die ASMA-positiven Bereiche rostbraun dar (Abbildung 18 A-H).

Es konnte gezeigt werden, dass die M_3R -defizienten CAIA-Mäuse im Vergleich zu den M_3R -defizienten Kontrollmäusen mit einem p-Wert von 0,0476 eine signifikant erhöhte Anzahl von Gefäßanschnitten und mehr verdickte Gefäße aufwiesen. Dies konnte für WT-Mäuse nicht beobachtet werden (Abbildung 19). Im Vergleich zu M_3R -defizienten Kontrolltieren zeigten WT-Kontrolltiere bereits einen erhöhten Score, welcher sich nicht erheblich durch die Induktion der Arthritis veränderte (Abbildung 19).

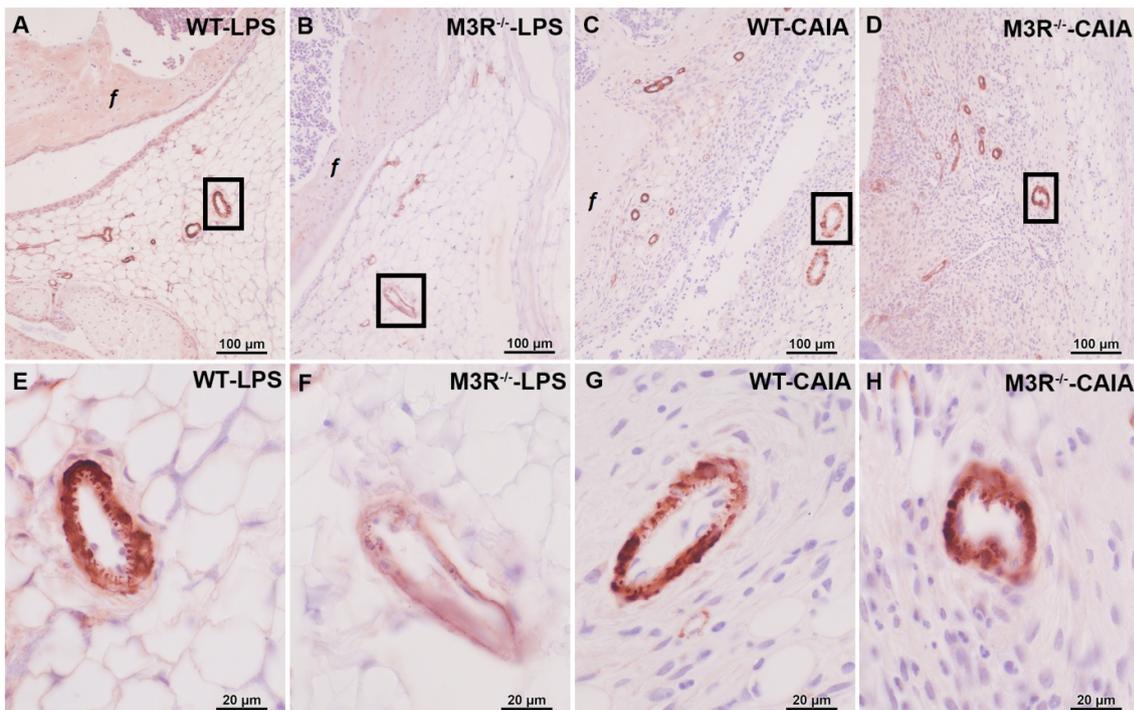


Abbildung 18: Analyse der ASMA-positiven Blutgefäße

Immunhistochemische ASMA-Färbung zur Beurteilung der Blutgefäße, Bereich im lateralen Kniegelenksspalt, mit *f* ist der Femur gekennzeichnet, die gerahmten Bildausschnitte aus A-D sind in den jeweils darunter liegenden Abbildungen E-H vergrößert dargestellt. Aus Beckmann et al. 2016

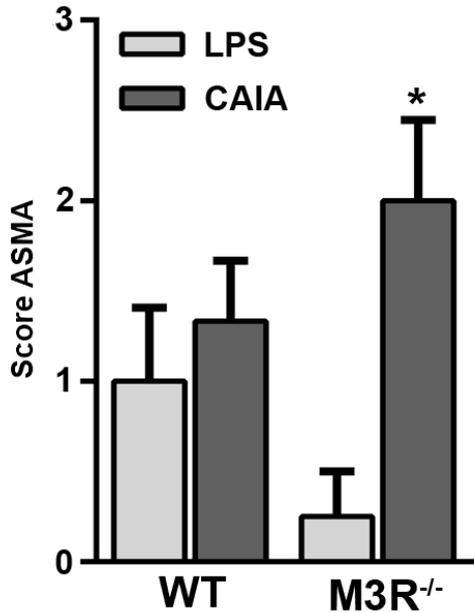


Abbildung 19: Histopathologischer ASMA-Score

Daten des ASMA-Scores wurden für die Gruppen gemittelt und dargestellt mit \pm SEM, * $p < 0,05$ für arthritische Tiere und ihre entsprechende Kontrollgruppe. Aus Beckmann et al. 2016

4.3 Histopathologische Veränderung von Knorpel und Knochen

Um die histopathologischen Veränderungen im Bereich von Knorpel und Knochen zu untersuchen, wurden verblindete Präparate mit folgenden Färbungen verwendet: Alcianblau-PAS für den Knorpel, Toluidinblau für den Knochen und die immunhistologische Darstellung von Kollagen II. Des Weiteren wurden die enzymhistochemischen TRAP- und ALP-Nachweise durchgeführt und mittels Zellzählung verglichen. Die histologischen Standardverfahren wurden mit einem Score (Tabelle 10) für die Kniegelenke ausgewertet. Dabei wurden die Erosion sowie die Überwucherung des Knorpels und das Ausmaß der Knochendestruktion bewertet. Der Kollagen II-Nachweis wurde an den Kniegelenken histomorphometrisch untersucht.

4.3.1 Knorpel

Alcianblau-PAS-Färbung Kniegelenke

Bei dieser Methode wurden saure Mukosubstanzen mit dem Alcianblau sichtbar gemacht und erschienen leuchtend blau. Bei der Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Reaktion fungierte die Perjodsäure als Oxidationsmittel, sodass durch sie entstandene Aldehyde nun mit Schiffs Reagenz zu leuchtend roten Komplexen reagierten, welche Polysaccharide und neutrale Mukosubstanzen anzeigten (Mulisch and Welsch 2015).

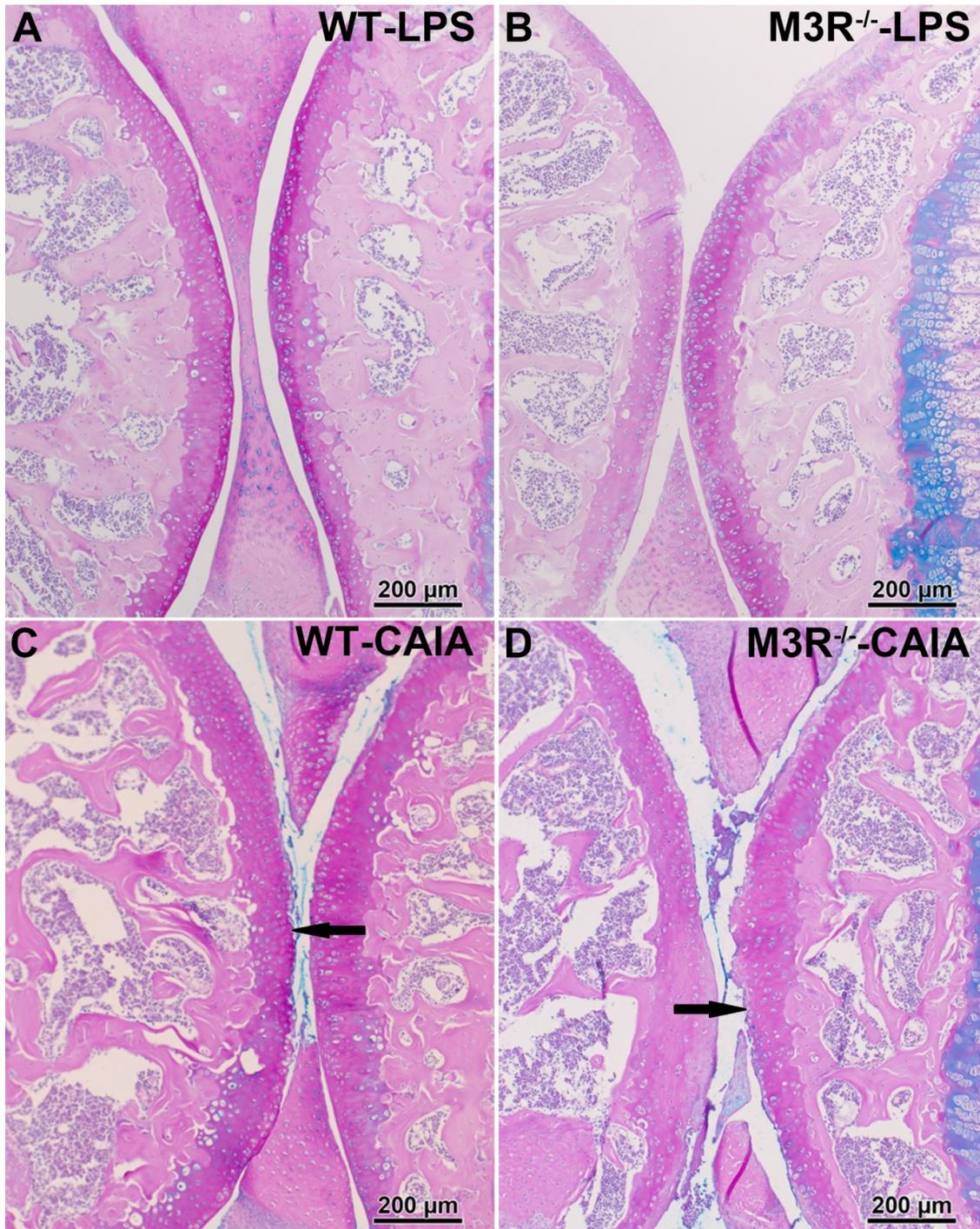


Abbildung 20: Alcianblau-PAS-Färbung, Kniegelenk

Aus Beckmann et al. 2016

A und B: physiologische, gut abgrenzbare Knorpelstruktur, mit glatter, nicht erodierter Oberfläche

C: WT-CAIA-Maus, der Pfeil markiert die erodierte Knorpeloberfläche mit teilweisen Knorpeldestruktionen

D: M3R^{-/-}-CAIA-Maus, Erosion der Knorpeloberfläche und Knorpeldestruktion (Pfeil)

In den Präparaten beider Kontrolltiergruppen stellten sich die Gelenkknorpelflächen sowohl an dem distalen Femurende als auch am Ende der proximalen Tibia homogen und mit glatter Oberfläche dar (Abbildung 20 A und B). Die Chondrozyten lagen

teilweise einzeln oder in kleinen Gruppen und waren vollständig von der Matrix umgeben (Abbildung 20 A und B, Abbildung 21 A Pfeil). Der Gelenkknorpel erschien bei diesen beiden Gruppen strukturiert, solide und gut abgrenzbar.

Bei den arthritischen Mäusen beider Gruppen war die Knorpeloberfläche erodiert (Abbildung 20 Pfeile in C und D) und zum Teil bis auf den subchondralen Knochen destruiert. Auch erschienen die Knorpelschichten teilweise aufgehoben und in einigen Präparaten war der hyaline Knorpel deutlich durch eine Pannusbildung infiltriert und an einigen Stellen durch diese vollständig ersetzt (Abbildung 22 und Abbildung 23). Diese Veränderungen waren vermehrt in den lateral gelegenen Knorpelbereichen des Gelenkspalts lokalisiert. Allerdings konnte vor allem die Oberflächenerosion auch im Zentrum des Gelenkspalts beobachtet werden (Abbildung 21 Pfeile mit Stern in B und C). Hier waren die Chondrone eröffnet und die Chondrozyten nicht weiter von ihrer Matrix umschlossen. Daraus ergab sich für die CAIA-Gruppen das Bild eines unvollständigen Knorpels mit aufgerauter Oberfläche, weniger geordneten Zellformationen und aufgehobenen Begrenzungen.

Wie bei der Betrachtung der SM war auch bei der Beurteilung des Knorpels ein deutlicher Unterschied zwischen den Kontrollmäusen und den arthritischen Mäusen zu sehen.

Allerdings war zwischen den M_3R -defizienten CAIA-Tieren und den WT-CAIA-Mäusen kein signifikanter Unterschied bezüglich pathologischer Knorpelveränderungen zu erheben (Abbildung 24).

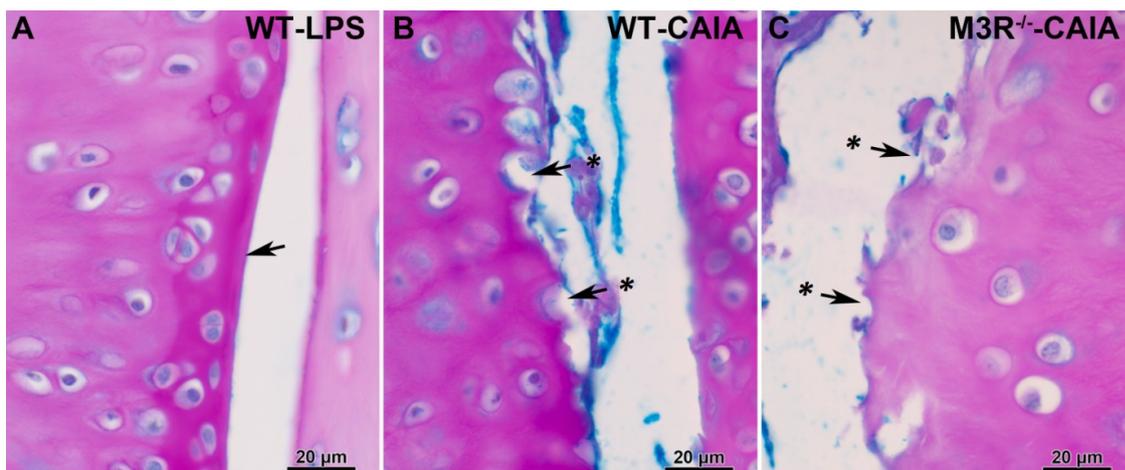


Abbildung 21: Alcianblau-PAS-Färbung, Knorpeloberfläche im Kniegelenk

Aus Beckmann et al. 2016

A: Knorpeloberfläche ist glatt begrenzt, Chondrone sind komplett von Matrix umgeben (Pfeil)
B und C: die Pfeile mit Stern zeigen die Erosion der Knorpeloberfläche sowie die eröffneten Chondrone und den Zellverlust nahe der Oberfläche

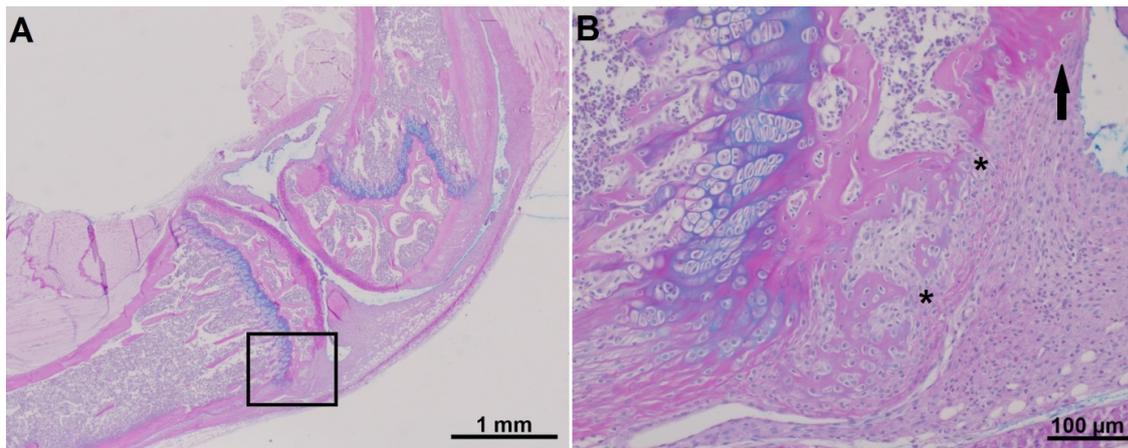


Abbildung 22: Alcianblau-PAS-Färbung, Kniegelenkdestruktion

A: Übersicht Kniegelenk einer M_3R -defizienten Maus, gerahmte Fläche vergrößert in B
 B: Vergrößerung aus A, das Pannusgewebe infiltriert den subchondralen Knochen (Sterne), überwuchert und infiltriert den Gelenkknorpel (Pfeil)

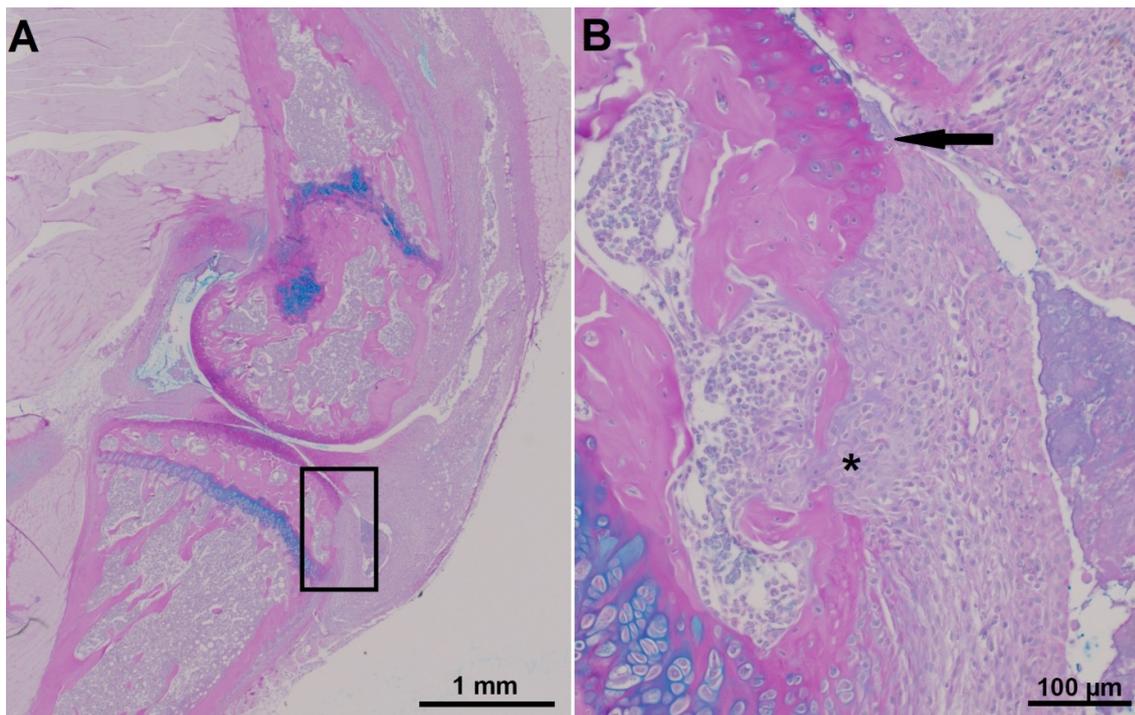


Abbildung 23: Alcianblau-PAS-Färbung, Pannus

A: Übersicht Kniegelenk einer WT-CAIA-Maus, gerahmtes Areal in B vergrößert
 B: Vergrößerung aus A, der subchondrale Knochen wird von Pannusgewebe zerstört (Stern), der Pannus überwuchert und infiltriert den hyalinen Knorpel (Pfeil)

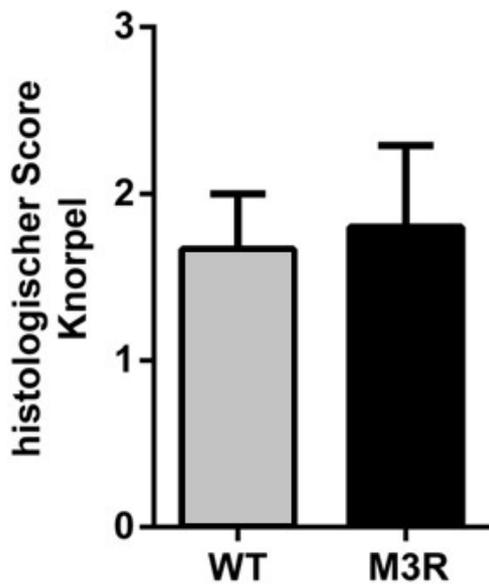


Abbildung 24: Quantifizierung histopathologischer Veränderung des Knorpels im Kniegelenk

Dargestellt als Mittelwert des histopathologischen Scores \pm SEM für arthritische WT (n = 7) und M₃R-defiziente Mäuse (n=7). Aus Beckmann et al. 2016

Kollagen II-Nachweis in den Kniegelenken

Kollagen II dient als Hauptbestandteil des hyalinen Knorpels und eignete sich deshalb als aussagekräftiger Marker für eine genauere Differenzierung der Knorpeldestruktion.

Für den Kollagen II-Nachweis wurden polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen verwendet und mittels Histomorphometrie wurden die Gelenkknorpellängen vermessen (Abbildung 7 A-C). Wobei Kollagen II-positive und -negative Bereiche für die Auswertung prozentual miteinander ins Verhältnis gesetzt wurden.

Bei den Kontrolltieren waren die Knorpelanteile, sowohl an Femur als auch Tibia, Kollagen II-positiv und stellten sich bräunlich dar. Bei den arthritischen Versuchstieren waren multiple Bereiche Kollagen II-negativ und dementsprechend auch nicht gefärbt (Pfeile in Abbildung 25 C und D). Die Kollagen II-negativen Bereiche waren über den gesamten Gelenkknorpel (lateral wie auch zentral) zu finden, wobei keine Tendenz für ein gehäuftes Auftreten an einer bestimmten Lokalisation auszumachen war.

Im Gruppenvergleich war der Anteil von Kollagen II-negativen Bereichen bei den M₃R-defizienten CAIA-Mäusen im Vergleich zu den WT-CAIA-Mäusen signifikant erhöht (p-Wert von 0,0371) (Abbildung 26).

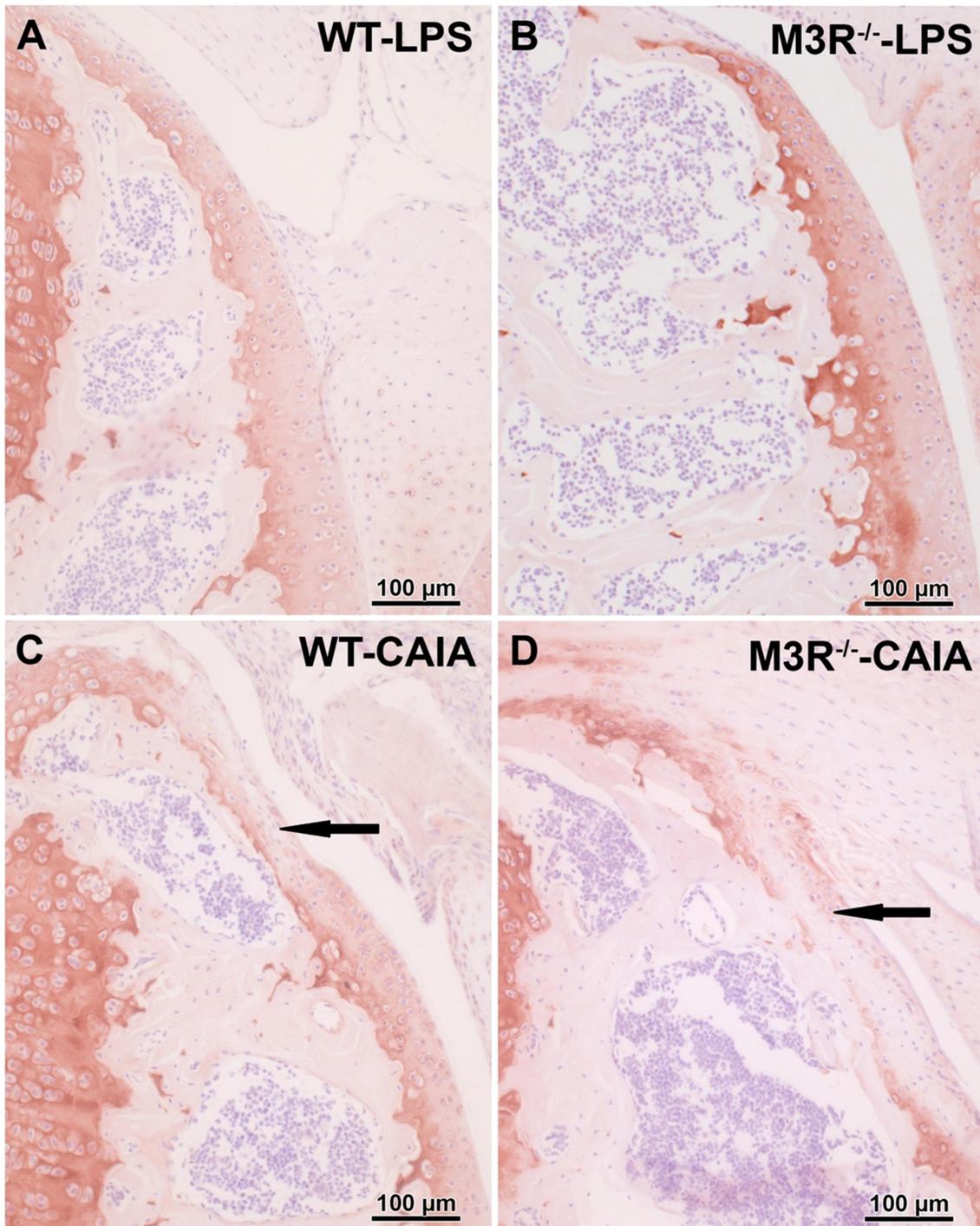


Abbildung 25: Immunhistochemischer Kollagen II-Nachweis, Kniegelenk

Aus Beckmann et al. 2016

A und B: Knorpel ist durchgehend Kollagen II-positiv dargestellt

C: WT-CAIA-Maus, Kollagen II-freie Bereiche im oberen Bilddrittel (Pfeil), Knorpelverlust reicht nicht bis auf den subchondralen Knochen

D: M3R^{-/-}-CAIA-Maus, Kollagen II-freie Knorpelbereiche (Pfeil) reichen bis auf den subchondralen Knochen

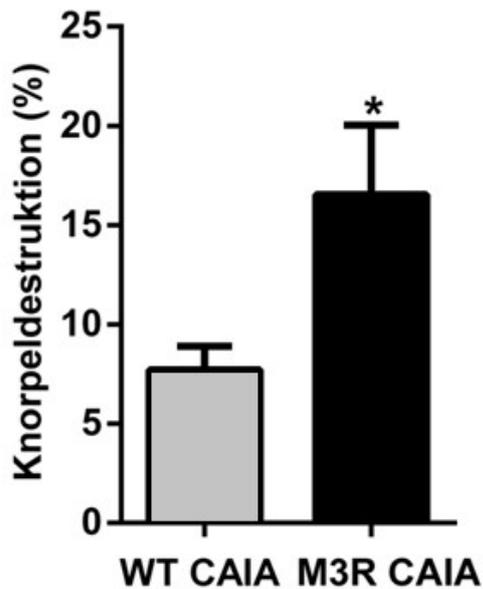


Abbildung 26: Quantifizierung des Kollagen II-Verlusts im Kniegelenksknorpel

Dargestellt als Mittelwerte des prozentualen Anteils \pm SEM für Kniegelenke von arthritischen WT- (n=7) und M3R^{-/-} (n=7)-Mäusen. * p < 0,05: M3R^{-/-}-CAIA im Vergleich zu WT-CAIA,

Aus Beckmann et al. 2016

Veränderung des Knorpels im Elektronenmikroskop

In der Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop fiel auf, dass bei den M₃R-defizienten CAIA-Mäusen im Vergleich zu den anderen drei Gruppen die Chondrozyten vermehrt verdichtetes Chromatin (Pfeil in Abbildung 27 D) und eine verstärkte Vakuolenbildung (V in Abbildung 27 D) im Zytoplasma aufwiesen. Grundsätzlich wirkten die Knorpelzellen der M₃R-defizienten CAIA-Tiere weniger vital.

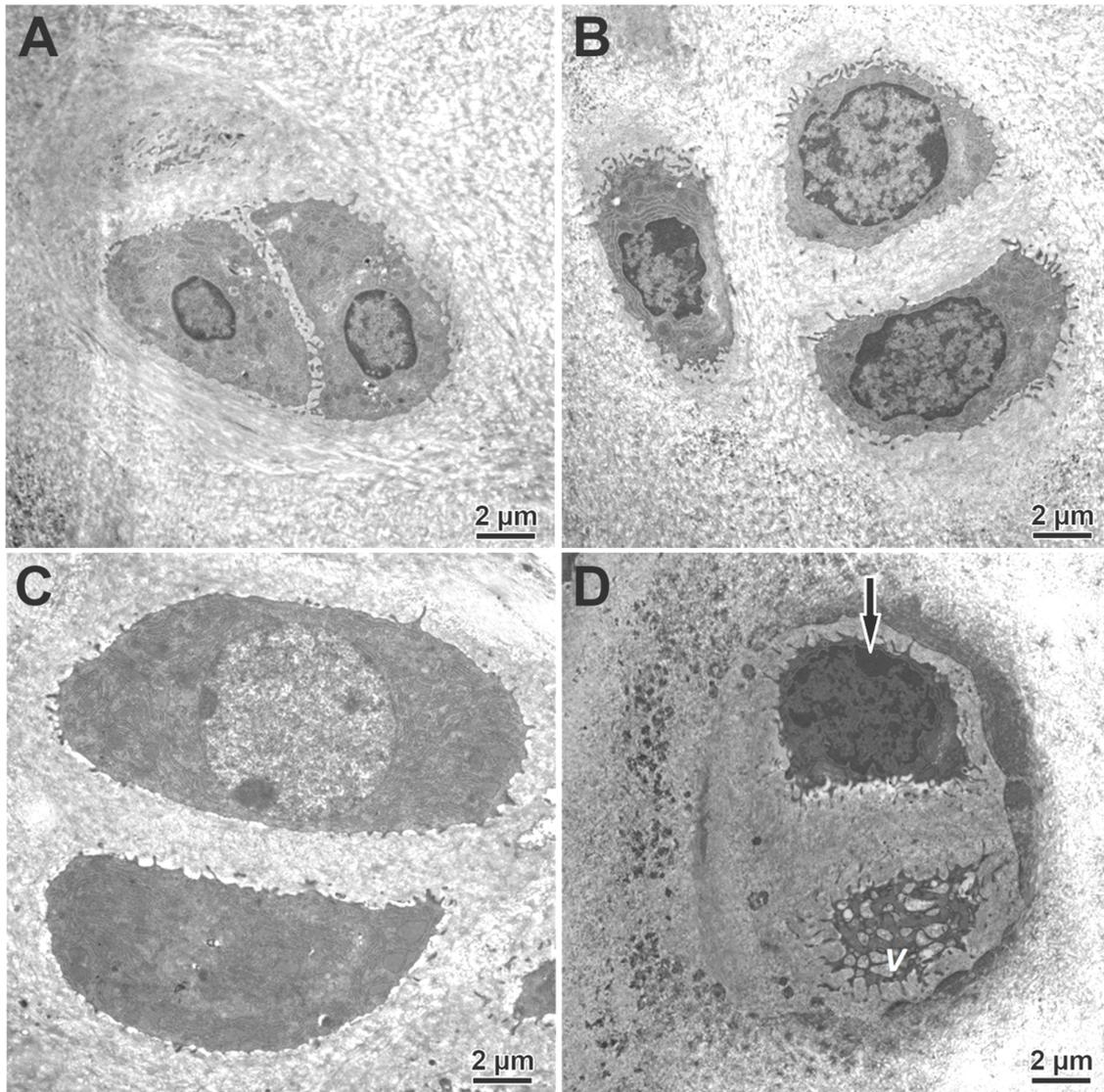


Abbildung 27: TEM von Chondrozyten, Kniegelenk

Aus Beckmann et al. 2016, Übersicht der Knorpelzellen aller vier Gruppen

A: WT-LPS-Maus, zwei Chondrozyten in einem Chondron

B: M3R^{-/-}-LPS-Maus, drei Chondrozyten in einem Chondron

C: WT-CAIA-Maus, zwei Chondrozyten in einem Chondron

D: M3R^{-/-}-CAIA-Maus, zwei Chondrozyten, mit verdichtetem Chromatin (Pfeil), vermehrt Vakuolen (V) und geschrumpften Zellkörpern

4.3.2 Knochen

Toluidinblau-Färbung

Die Toluidinblau-Färbung wurde in dieser Arbeit für die Beurteilung der Knochenstruktur verwendet. Toluidinblau ist ein basischer Farbstoff, welcher anionische Strukturen darstellt (Schmitz et al. 2010). Zellen und ihre Kerne wie auch

Kollagenfasern und Osteoidsäume färbten sich blau, Knorpelmatrix hingegen stellte sich blassviolett dar und die mineralisierten Hartschubstanzen blassblau.

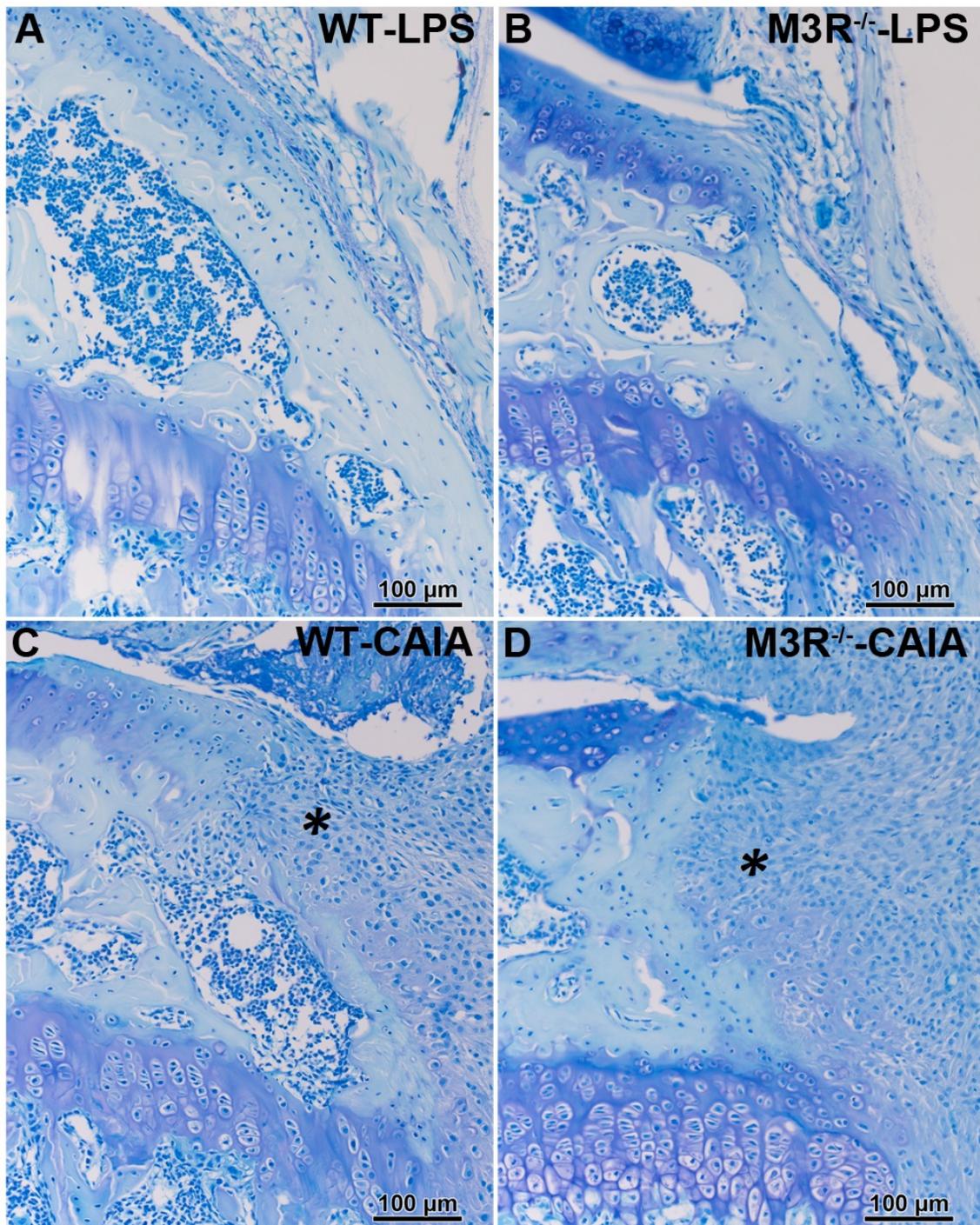


Abbildung 28: Toluidinblau-Färbung, Kniegelenk

Aus Beckmann et al. 2016

A und B: gut abgrenzbare, physiologische Knochenstruktur

D und C: Infiltration und Auflösung der Trabekelstruktur durch Pannusgewebe (Stern) im lateralen Teil des Gelenkspalts

Die Präparate der Kontrollgruppen zeigten eine glatt begrenzte Knochenstruktur, subchondral wie auch im direkten Kontakt zur SM. Ebenso war das Trabekelwerk intakt (Abbildung 28 A und B). Sowohl in Femur als auch in der Tibia erschien der Knochen auch in den Übergangsbereichen homogen und nicht destruiert bzw. infiltriert.

In den Präparaten der CAIA-Gruppen konnten deutliche Veränderungen erhoben werden. Der Knochen verlor seine glatte Begrenzung und wirkte stellenweise angefressen. Dazu kam eine teilweise fulminante Infiltration durch das Pannusgewebe, welches häufig bis in die Knochenmarksräume reichte und das Trabekelwerk partiell auflöste (Stern in Abbildung 28 C und D sowie Abbildung 31 A).

Die massivsten Umbauten konnten im lateralen Bereich des Gelenkspalts betrachtet werden, wo sie zum Teil auch die Epiphysenfuge erreichten (Abbildung 29 B). Der subchondrale Knochen wurde infiltriert, auch wenn der Knorpel über diesen Flächen noch nicht vollständig aufgelöst bzw. von Pannusgewebe ersetzt war.

Damit war auch bei der Beurteilung der pathologischen Knochenveränderung ein deutlicher Unterschied zwischen den Kontroll- und den Arthritis-Tieren gegeben.

Durch den histologischen Score konnte in Bezug auf die Knochenveränderungen auch ein statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert von 0,0087) zwischen den M₃R-defizienten CAIA-Mäusen und den WT-CAIA-Mäusen erhoben werden. Hier war der Knochen der M₃R-defizienten CAIA-Mäuse deutlich stärkeren pathologischen Veränderungen unterworfen als der der WT-CAIA-Tiere (Abbildung 30).

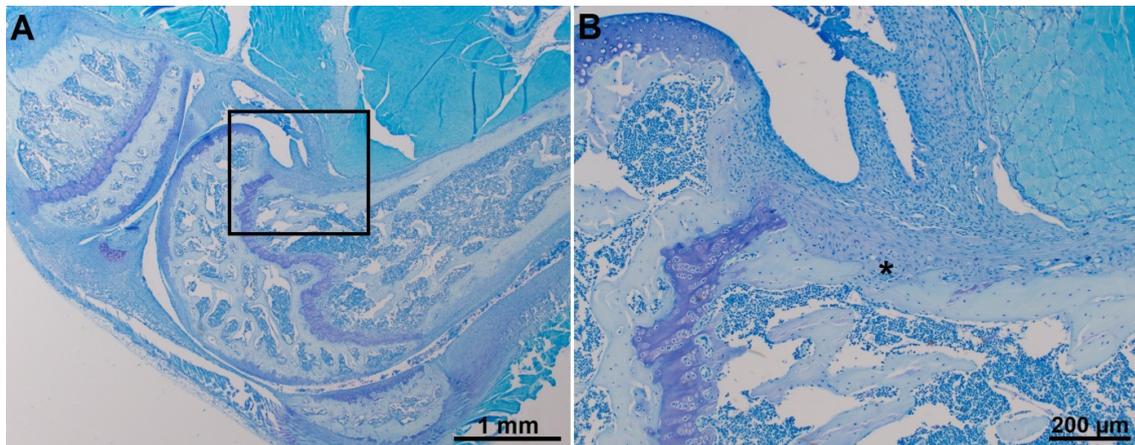


Abbildung 29: Toluidinblau-Färbung, Knochendestruktion

A: Übersicht eines WT-CAIA-Kniegelenks, das Areal im Rahmen ist vergrößert in B

B: Femur, Pannus-Infiltration (Stern) des Knochens im Bereich der Epiphyse und Metaphyse

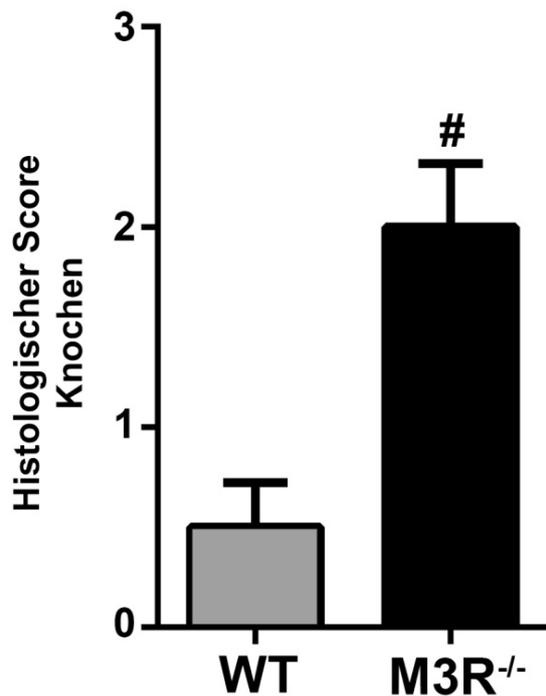


Abbildung 30: Histologischer Score Knochen

Quantifikation der histopathologischen Veränderung des Knochens im Kniegelenksbereich zwischen WT-CAIA und M3R^{-/-}-CAIA-Mäusen (nur inzidente Tiere), Gruppenmittelwerte des Scores zur Beurteilung der Kniegelenke (Tabelle 10) dargestellt mit ± SEM (# p < 0,05 M3R^{-/-}-CAIA im Vergleich zu WT-CAIA-Tieren). Aus Beckmann et al. 2016

TRAP-Nachweis

Diese enzyspezifische Färbung erfolgte um TRAP-positive Zellen wie ein- oder mehrkernige Makrophagen sowie die vielkernigen Osteoklasten zu finden und eine mögliche verstärkte Aktivität in den erosiven Knochenabschnitten aufzuzeigen.

Die Zellkerne stellten sich hierbei blau dar, Osteoklasten sowie ihre Fortsätze färbten sich rötlich. Die Präparate wurden am Lichtmikroskop ausgewertet, hier befanden sich die TRAP-positiven Zellen verstärkt in den destruierten Bereichen des Knochens (Abbildung 31 A und B und Abbildung 32) in der Nähe zum Gelenkspalt, allerdings auch vereinzelt und gelenkspaltfern im Trabekelwerk des Knochens. Die mehrkernigen TRAP-positiven Zellen in jedem Präparat wurden gezählt. Dabei konnte zwischen den M₃R-defizienten CAIA-Mäusen (nur inzidente Mäuse beachtet) und den Kontrolltieren der gleichen Gruppe ein deutlicher Unterschied in der Anzahl der vorkommenden Osteoklasten festgestellt werden, welcher mit einem p-Wert von 0,0006 auch statistisch signifikant war (Abbildung 33).

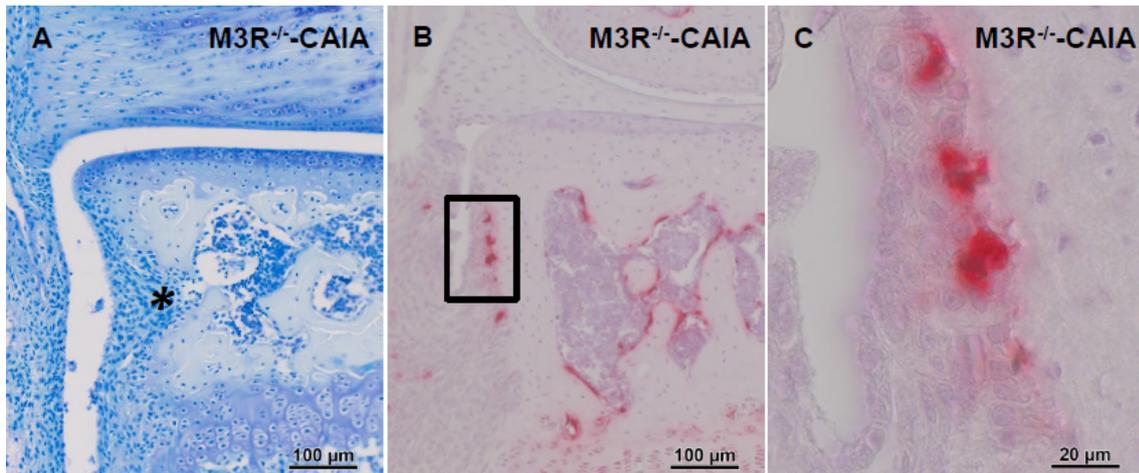


Abbildung 31: Enzymhistochemischer TRAP-Nachweis, Kniegelenk

Aus Beckmann et al. 2016

A: Toluidinblau-Färbung, aufgelöste Trabekelstruktur durch Pannusgewebe im lateralen Gelenkspalt (Stern)

B: TRAP-positive Zellen im Bereich der Knochendestruktion des in A mit Stern gekennzeichneten Areals

C: Vergrößerung der gerahmten Fläche aus B, mehrere TRAP-positive Zellen

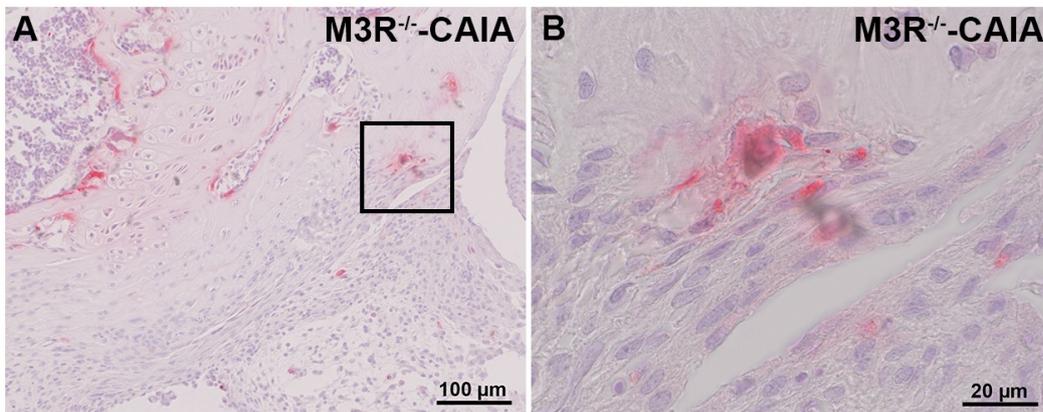


Abbildung 32: TRAP-positive Zellen, Femur

A: Femur, im lateralen Gelenkspalt TRAP-positive Zellen an der Pannus-Knochen-Grenze (gerahmte Fläche)

B: Vergrößerung der gerahmten Fläche aus A, TRAP-positive Zelle

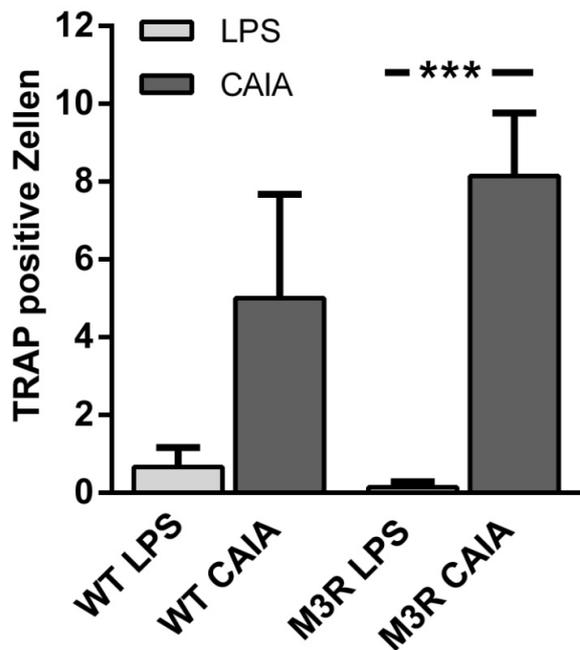


Abbildung 33: Quantifizierung TRAP-positiver Zellen in den Versuchsgruppen

(***: TRAP-positive Zellen bei M_3R -defizienten CAIA-Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu den M_3R -defizienten LPS-Tieren (p -Wert = 0,0006)). Aus Beckmann et al. 2016

ALP-Nachweis

Um mögliche Knochenumbauvorgänge weiter zu beurteilen, wurden die Präparate auch auf das Vorkommen von Osteoblasten mittels ALP-Nachweis untersucht. Hierbei färbt sich der Saum der Osteoblasten blauviolett und durch die Kernechtrot-Gegenfärbung stellt sich der Kern rötlich dar. Im Anschluss wurden die Präparate am Lichtmikroskop quantifiziert.

In den ALP-Präparaten fanden sich hierbei nur wenige vereinzelte ALP-positive Zellen, sodass hier ein Vergleich zwischen den Gruppen nicht durchgeführt werden konnte.

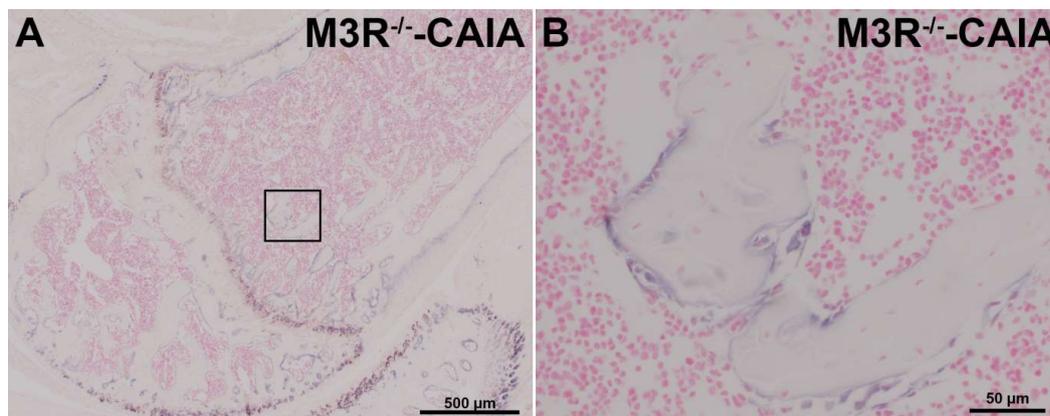


Abbildung 34: Enzymhistochemischer ALP-Nachweis, Femur

A: ALP-Nachweis, Übersicht, gerahmte Fläche ist in B vergrößert

B: Nachweis von ALP-positiven Zellen

Veränderung des Knochens im Elektronenmikroskop

In der TEM konnten im Vergleich zu den Kontrolltieren bei den arthritischen Tieren einige Veränderungen gezeigt werden. Die Osteozyten hatten bei den Kontrolltieren durchweg eine physiologische Ultrastruktur (Abbildung 35 A und B).

Hingegen zeigten die WT-CAIA-Mäuse einige Osteozyten mit einem leicht geschwollenen Aussehen (Abbildung 35 C). Ähnliche ultrastrukturelle Veränderungen konnten auch bei einigen Osteozyten von arthritischen M₃R-defizienten Mäusen beobachtet werden, jedoch zeigte die Mehrzahl der Osteozyten aus dieser Gruppe eine starke Schrumpfung des Zytoplasmas sowie eine massive Erweiterung des perizellulären Spalts (Pfeil in Abbildung 35 D). Generell wirkten die Osteozyten der arthritischen M₃R-defizienten Tiere im Vergleich zu denen der Kontrollgruppen weniger physiologisch.

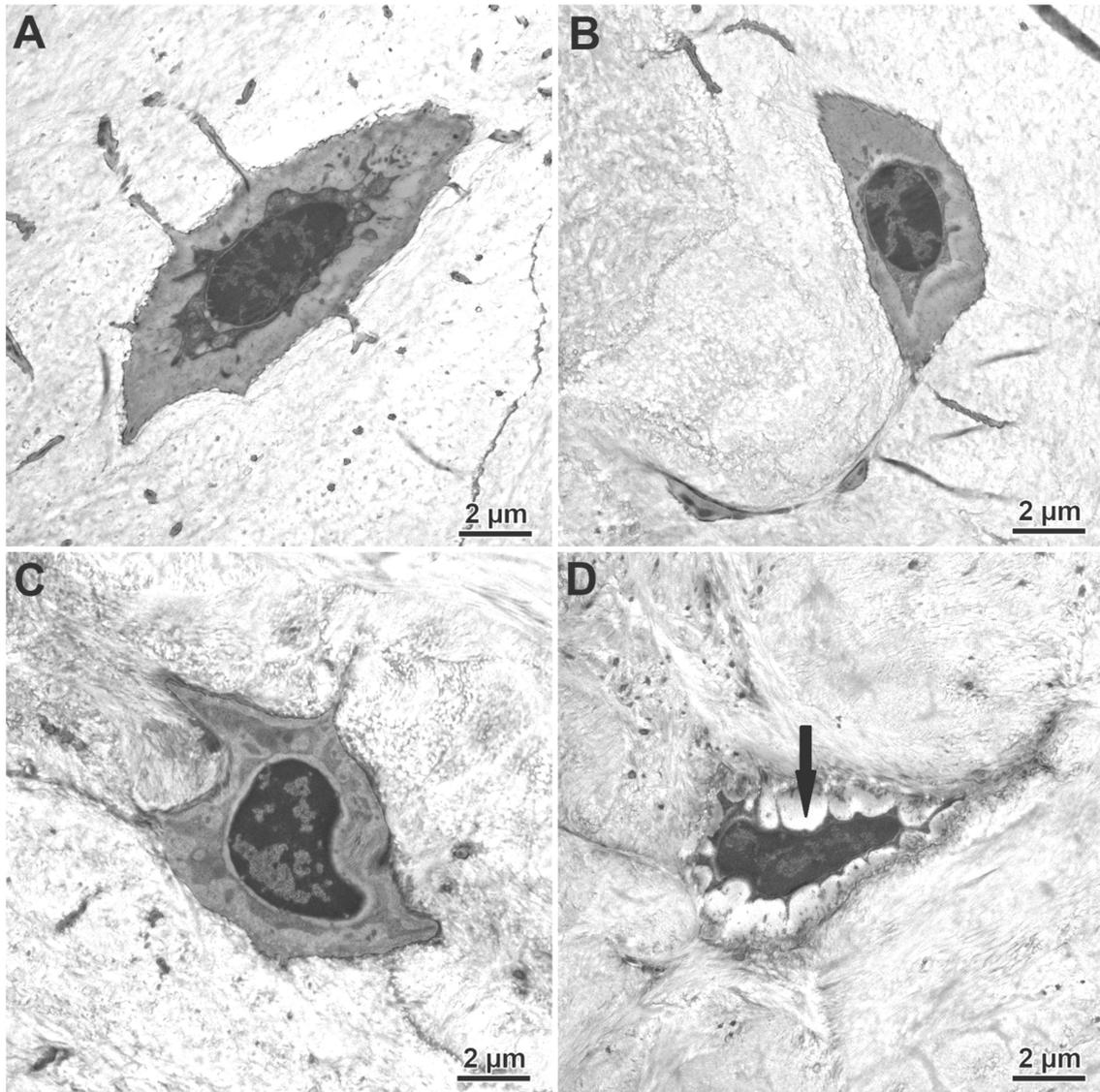


Abbildung 35: TEM der Osteozyten, Kniegelenk

Aus Beckmann et al. 2016

A: WT-LPS, Osteozyt mit physiologischem Erscheinungsbild

B: M3R^{-/-}-LPS, Osteozyt mit physiologischer Zellstruktur

C: WT-CAIA, Osteozyt mit scheinbar geschwollenem Zelleib

D: M3R^{-/-}-CAIA, Osteozyt mit stark verbreitertem perizellulären Bereich (Pfeil) und geschrumpftem zytoplasmatischen Raum

4.3.3 Tabellarische Ergebniszusammenfassung

Tabelle 12: Ergebniszusammenfassung

M₃R^{-/-}-CAIA	WT-CAIA
<i>Klinische Ergebnisse</i>	
<u>Kumulativer Arthritis-Score</u>	
Kein signifikanter Unterschied	
<u>Belastungsscore</u>	
Signifikant höhere Wert im Score als die WT-CAIA-Tiere (p < 0,01)	Niedrigere Werte als die M ₃ R-defiziente CAIA-Gruppe
Signifikant stärkerer Gewichtsverlust als die WT-CAIA-Gruppe (p = 0,035)	Mäßigerer Gewichtsverlust
<i>Histologische Ergebnisse</i>	
<i>SM</i>	
<u>HE-Färbung</u>	
Kein signifikanter Unterschied Verdickte synoviale Intima, verstärkte subintimale Zellinvasion, vermehrte Gefäßanschnitte, Ausbildung eines Pannus	
<u>ASMA-Färbung</u>	
Erhöhte Anzahl von Gefäßanschnitten und vermehrt verdickte Gefäßanschnitte (p = 0,0467)	Geringere Anzahl von Gefäßanschnitten und Verdickungen
<i>Knorpel</i>	
<u>Alcianblau-PAS-Färbung</u>	
Kein signifikanter Unterschied Erosion der Knorpeloberfläche, Eröffnung der Chondrone, Destruktion bis in den subchondralen Knochen, Infiltration und Knorpelverlust durch das Pannusgewebe	
<u>Kollagen II-Nachweis</u>	
Signifikant vermehrt Kollagen II-negative Bereiche als in den WT-CAIA-Kniegelenken (p = 0,0371)	Geringerer Kollagen II-Verlust
<i>Knochen</i>	
<u>Toluidinblau-Färbung</u>	
Signifikant stärkere Knochendestruktion im Vergleich zu der Kontrollgruppe (p = 0,0087)	Weniger stark ausgeprägte Knochendestruktionen
<u>TRAP-Nachweis</u>	
Signifikant höheres Vorkommen TRAP-positiver Zellen (p = 0,0006)	Vereinzelt Vorkommen TRAP-positiver Zellen
<u>ALP-Nachweis</u>	
Zu wenig ALP-positive Zellen in den Präparaten, um eine Auswertung zu ermöglichen.	

5 Diskussion

Diese Arbeit verfolgte das Ziel, die mögliche Auswirkung der M₃R-Defizienz auf die Ausprägung von arthritischen Symptomen im Rahmen des CAIA-Modells zu prüfen. Hierbei fanden M₃R-defiziente und WT-Mäuse Verwendung. Dies erfolgte zum einen mittels visueller Betrachtung der Gelenkschwellung sowie Beobachtung des Körpergewichts und des Allgemeinzustands der Tiere und zum anderen über histologische und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen.

Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert und Studien mit ähnlichen Fragestellungen dienen dem Vergleich und der Bewertung.

5.1 Das Tierversuchsmodell

Unter der Vielzahl experimenteller muriner Arthritis-Modelle gibt es keins, welches den humanen Krankheitsverlauf 100%ig widerspiegelt, allerdings können diverse der komplexen Aspekte aussagekräftig nachgeahmt werden (Bessis et al. 2017). Der hier vorgestellten Studie lag das Modell der CAIA zu Grunde.

Hier konnte durch die Verabreichung einer Kombination aus fünf verschiedenen monoklonalen Kollagen II-Antikörpern eine akute Polyarthritis in naiven Mäusen ausgelöst werden (Nandakumar et al. 2003). Das CAIA-Modell eignete sich sehr gut für die Untersuchung der inflammatorischen Effektor-Phase der Arthritis.

Zu den Vorteilen des CAIA-Modells zählten unter anderem, dass keine Major-Histocompatibility-Complex (MHC)-Abhängigkeit vorliegt. Daher können auch Mausstämme (wie in dieser Studie C57BL/6-Mäuse) verwendet werden, welche in anderen Modellen wie der Kollagen II-induzierten Arthritis (CIA) verstärkt Resistenzen aufzeigen und selbst nach neuen Protokollen eine Krankheitsinzidenz von nur 60% erreichen (Inglis et al. 2007). Unter Anwendung des 5-Klon-Cocktails konnte auch mit geringer Antikörperkonzentration in C57BL/6-Mäusen eine sehr gute Krankheitsinduktion erzielt werden (Hutamekalin et al. 2009). Dieser enthält monoklonale Antikörper, die gegen verschiedene Epitope arthrogener Domänen wie LyC-1 und LyC-2 des FB11-Fragments von Kollagen II gerichtet sind. In der vorliegenden Studie wurde der 5-Klon-Cocktail der Firma Chondrex verwendet, da er bereits in anderen Studien erfolgreich zum Einsatz kam (Hutamekalin et al. 2009; Pisitkun et al. 2010). In der Literatur werden 2-8 mg Antikörper-Mix pro Maus appliziert. Hier wurden 0,2 mg pro g KG also ungefähr 5 mg pro Maus eingesetzt, da diese Konzentration zulässt, sowohl eine mögliche Verbesserung als auch Verschlechterung

der arthritischen Symptome der WT im Vergleich zu den M₃R-defizienten Tieren zu erkennen.

Die Gabe von LPS am dritten Tag nach Antikörpergabe war nötig, um bei den C57BL/6-Mäusen die Arthritis auszulösen, hierdurch sinkt die benötigte Antikörperkonzentration (Terato et al. 1995) und die Krankheitsinduktion wird in hohem Maße synchronisiert. Das LPS wurde ebenfalls von Chondrex bezogen und in einer Dosis von 2 µg pro g KG also etwa 50 µg pro Maus appliziert, da es in vielen Veröffentlichungen erfolgreich eingesetzt werden konnte (Maia et al. 2010; Pisitkun et al. 2010).

Durch die Synchronisation wird im CAIA-Modell die Reproduzierbarkeit stark gesteigert, was für den Vergleich unterschiedlicher Gruppen und die Auswertung des Versuchs vorteilig war. Nach der LPS-Applikation bestand im weiteren Versuchsablauf kein geschlechtsspezifischer Unterschied (Banda et al. 2007). So konnten demnach beide Geschlechter dem Versuch zugeführt werden. Des Weiteren kam es zu einem schnellen Krankheitsausbruch (Hirose und Tanaka 2011) und der Versuch wurde bereits am zehnten Tage nach Antikörpergabe beendet, da zu diesem Zeitpunkt sowohl eine Erhöhung der Entzündungsparameter als auch eine Veränderung des Knochens, der SM und des Knorpels im arthritischen Gelenk zu beobachten ist (Giguère et al. 2013).

Dieser schnelle Versuchsablauf eignete sich, um die akut inflammatorische Phase der rheumatoiden Arthritis zu untersuchen. Dabei wurden hier die Tiere einem kürzeren und milderem Krankheitsverlauf ausgesetzt als in anderen Arthritis-Modellen (wie zum Beispiel dem der CIA). Allerdings lässt sich mit dem CAIA-Modell nicht die Chronizität der Erkrankung analysieren. Zusätzlich ist der direkte Vergleich zwischen der zügigen RA-Entwicklung bei den Mäusen und dem chronischen Krankheitsverlauf, welcher typischerweise bei Menschen auftritt, limitiert (Khachigian 2006).

5.2 Bewertung der Arthritis

Die Bewertung der Arthritis erfolgte in dieser Studie durch die Verwendung von etablierten sowie selbst erarbeiteten Scores und der Knorpellängenmessung via Histomorphometrie. Dieses Vorgehen wird in den folgenden Abschnitten diskutiert.

Der kumulative Arthritis-Score

In der Literatur gibt es verschiedene Möglichkeiten den Schweregrad der Arthritisymptome methodisch zu quantifizieren.

Die wahrscheinlich detaillierteste Methode ist die sogenannte „gait Analyse“. Hier wird das Gangbild der Maus auf einem Laufband mit einem integrierten digitalen Auswertungssystem erfasst und bewertet (Vincelette et al. 2007; Parvathy und Masocha 2013). Diese Methode ist für die Tiere allerdings mit erhöhtem Stress verbunden, da sie zum Laufen gezwungen werden müssen und mit fortgeschrittenen Symptomen steigt auch deren Belastung.

Eine weitere Möglichkeit ist die Messung der Gelenkschwellung über die Wasserverdrängung mittels eines Plethysmometers. Dieses Verfahren ist bei Versuchen mit Ratten etabliert, für die Untersuchung von Mäusen jedoch wenig geeignet, aufgrund der minimalen Veränderungen und damit einhergehender geringer Genauigkeit sowie schlechter Reproduzierbarkeit. Des Weiteren führt hier die mechanische Stimulation zu einer verstärkten Belastung der Versuchstiere.

Ein weiteres Vorgehen zur Bewertung der Arthritis ist die visuelle Betrachtung. Dabei finden „Bewertungsscores“ Verwendung, welche die Gelenkschwellung der Pfoten von 0 bis 4 angeben, wobei 0 keine Schwellung und 4 eine sehr starke Schwellung des Gelenks bedeutet (Brand et al. 2007). In dieser Studie war die visuelle Betrachtung und Quantifizierung der Gelenkschwellung ohne zusätzliche mechanische Belastung für die Beantwortung der Fragestellung ausreichend und für die Versuchstiere vergleichsweise schonend.

Zu dem hier verwendeten „Bewertungsscore“ (Kumulativer Arthritis-Score Tabelle 8), welcher bei Irmeler beschrieben ist (Irmeler et al. 2014), wurde in dem Labor von Prof. Dr. Kamradt der Universität Jena eine detaillierte Bewertungsmethode erarbeitet, welche unter anderem eine getrennte Betrachtung von Zehenwurzel und Zehenmitte beinhaltet und dadurch eine hohe Datenreproduzierbarkeit auch bei unterschiedlichen Experimentatoren ermöglicht.

Der Belastungsscore

Dieser Score (Tabelle 9) diente zur Früherkennung von Belastungen bei den Tieren während des Tierversuchs und wurde von den Tierschutzbeauftragten der Universität Gießen herausgegeben (Score sheets — Justus-Liebig-Universität Gießen 2013). Er wurde mindestens einmal täglich für alle Mäuse erhoben. So konnte frühzeitig interveniert werden, um starke Belastungen der Tiere abzuwenden, zum Beispiel durch die Gabe von energiereicher Nahrung.

Da er neben dem Körpergewicht auch versuchsspezifische Kriterien enthielt, eignete er sich ebenfalls sehr gut zur Verlaufsbeurteilung über den gesamten Versuchszeitraum.

Histologischer Score zur Beurteilung der Kniegelenke

Für die histologische Auswertung der Kniegelenke wurde in dieser Studie ein Score zur Bewertung der arthritischen Veränderungen in den Bereichen SM, Knorpel und Knochen erarbeitet. In diesen drei Kategorien wurden Score-Werte von 0 für keine Veränderung bis 3 für schwere Veränderung der entsprechenden Kategorie (Tabelle 10) vergeben.

Hierbei lehnt sich der Score in der Kategorie SM an den gut etablierten Synovitis-Score an (Slansky et al. 2010; Krenn et al. 2012). Allerdings wurden in dieser Studie die im Synovitis-Score getrennten Kategorien (synoviale Deckzellschicht, synoviales Stroma und die Zellinvasion) vereint. In den Kategorien Knorpel und Knochen wurden arthritistypische Veränderungen wie Erosion, Destruktion und Substanzverlust dem Ausmaß ihres Auftretens nach den unterschiedlichen Schweregraden zugeordnet. Ähnliche Graduierungen fanden sich auch in anderen Scores, welche in der Literatur der Beurteilung arthritischer Gelenke dienen (Saamanen et al. 2000; Tanaka et al. 2016).

Die SM wurde am Lichtmikroskop anhand der HE gefärbten, der Knorpel mit den Alcianblau-PAS-Hämatoxylin-gefärbten und der Knochen mit den Toluidinblau-gefärbten Präparaten beurteilt. Dabei waren alle Präparate verblindet.

Histologischer Score zur Quantifizierung ASMA-gefärbter Schnitte

Der für diese Studie erstellte Score für die Auswertung der ASMA-Präparate ermöglichte ebenfalls eine Score-Wert-Vergabe von 0 bis 3 (Tabelle 11). Hier wurden die Anzahl der Gefäßanschnitte und die Gefäßwanddicke im Bereich der SM betrachtet. Die Blutgefäße konnten nicht ausgezählt werden, da nicht nachvollziehbar war, ob ein Gefäß mehrfach oder nur einfach in einem Schnitt angeschnitten wurde und ein verstärktes Vorkommen im Bereich von Band- und Meniskusstrukturen zu beobachten war. Aus diesem Grund wurde die Menge der Anschnitte in drei Abstufungen (wenige, vermehrt und viele) gruppiert und Bereiche um Meniskus und Bandstrukturen ignoriert. Ebenfalls wurde die Wandstärke der angeschnittenen Gefäße beurteilt, hierbei wurde das Vorkommen verdickter Gefäßanschnitte in Beziehung zu der Gesamtanzahl von Gefäßanschnitten in einem Präparat bewertet, da hier ebenfalls nicht ausgeschlossen werden konnte, dass ein verdicktes Blutgefäß in seinem Verlauf mehrfach angeschnitten wurde. Somit bietet dieser Score eine Annäherung an die tatsächliche Häufigkeit von dem Gefäßvorkommen und Wandverdickungen im Bereich der SM. Bei der Score-Wert-Vergabe waren die Präparate verblindet.

Histomorphometrie

Zur Quantifizierung eines möglichen Knorpelverlusts im Kniegelenk der arthritischen Mäuse eignete sich die Histomorphometrie an den Kollagen II-gefärbten Präparaten. Hierbei musste berücksichtigt werden, dass die Gelenkspaltlänge der einzelnen Mäuse variierte und unterschiedliche medial oder lateral gelegene Anschnittebenen in den einzelnen Präparaten vorlagen. Um diesen Umständen gerecht zu werden, wurde für jedes Kniegelenk die Länge der intakten Kollagen II-positiven Bereiche sowie die Länge der destruierten Kollagen II-negativen Bereiche einzeln gemessen und prozentual miteinander ins Verhältnis gesetzt.

5.3 Klinische Auswirkungen auf die Versuchstiere

5.3.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede der Arthritisausprägung

In dieser Studie wurden sowohl weibliche als auch männliche ca. zwölf Wochen alte Mäuse dem Experiment zugeführt, da in anderen Studien durch die LPS-Applikation geschlechtsspezifische Unterschiede aufgehoben werden konnten (Banda et al. 2007; Nandakumar et al. 2003). Allerdings zeigten in unserem Versuch die männlichen CAIA-Tiere deutlich stärkere Arthritissymptome als die Weibchen beider CAIA-Gruppen. Ebenso kam es bei den männlichen Mäusen zu einem früheren Auftreten erster Symptome und einer höheren Krankheitsinzidenz im gesamten Versuchsverlauf. Die männlichen CAIA-Tiere hatten im Vergleich zu den Weibchen ab Tag vier deutlich höhere Werte im kumulativen Arthritis-Score. Die M₃R-defizienten Männchen zeigten eine leicht höhere Inzidenz als die entsprechenden WT-Männchen, allerdings gab es in der Symptomintensität keine erheblichen Unterschiede.

Bei der RA im Menschen wird in den meisten Artikeln weltweit ein höherer Anteil an weiblichen Erkrankten beschrieben (Di et al. 2016). In einer pakistanischen Studie konnte jedoch in der Altersklasse von 50- bis 75-jährigen Patienten ein um 20% höherer Anteil männlicher zu weiblichen Erkrankten gezeigt werden (Alam et al. 2011), was sich über die scheinbar altersabhängige geschlechtsspezifische Inzidenzentwicklung der Arthritis erklären könnte (Symmons et al. 1994).

Geschlechtsspezifische Unterschiede bei Versuchstieren, wie in diesem Experiment, sind aus dem CIA-Modell bekannt (Holmdahl et al. 1986). Als mögliche Ursache für die erhöhte Inzidenz und Symptomausprägung bei den männlichen Mäusen wurde in der Literatur die protektive Wirkung weiblicher Hormone wie Östrogen für Menschen wie auch Versuchstiere diskutiert (Jansson et al. 1990).

5.3.2 Verlaufsbeobachtung im Belastungsscore

Die Auswertung des Belastungsscores zeigte eine deutlich stärkere Beeinträchtigung der M₃R-defizienten Mäuse. Dies war sowohl bei den arthritischen Tieren als auch bei den LPS-Kontrolltieren im Vergleich zu ihren entsprechenden WT-Gruppen deutlich über große Teile des Versuchs ersichtlich. Die Beeinträchtigung im Belastungsscore war für die CAIA-Gruppen statistisch signifikant.

Wie zu erwarten stiegen die Werte aller vier Gruppen bereits einen Tag nach der LPS-Gabe deutlich an, die Werte stabilisierten sich bereits zwischen Tag sechs und sieben. Neben der Arthritisbewertung zeigten sich ab Tag vier auch Veränderungen im Allgemeinzustand, dem Spontanverhalten und dem Körpergewicht.

Die Körpergewichtskontrolle wurde täglich mindestens einmal durchgeführt. Hier präsentierten die M₃R-defizienten CAIA-Mäuse ebenfalls eine signifikante Gewichtsreduktion im Vergleich zu ihrer LPS-Kontrollgruppe sowie zur entsprechenden WT-CAIA-Gruppe. Außerdem zeigte sich auch bei den M₃R-defizienten Kontrolltieren im Vergleich zu den WT-Kontrollmäusen eine stärkere Gewichtsreduktion. Um einen dadurch möglichen Versuchsabbruch für einige der Tiere abzuwenden, erhielten alle Mäuse ab dem dritten Tag nach Antikörpergabe energiereiches Futter sowie zum Teil zuckerhaltiges Wasser. Diese Interventionen sorgten für eine Stabilisierung oder eine Steigerung des Gewichts. Somit lässt sich vermuten, dass die Gewichtsreduktion ohne diese Interventionen noch deutlich stärker ausgefallen wäre.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die M₃R-Defizienz mit einer verminderten Nahrungsaufnahme, einer Verringerung der peripheren Fettspeicher, abnehmendem Körpergewicht und einem erhöhten Energieumsatz einhergeht. Es wird vermutet, dass diese Effekte auf eine Steigerung der zentralen Sympathikusaktivität und eine Geschwindigkeitszunahme der Fettsäureoxidation zurückzuführen sind (Yamada et al. 2001; Gautam et al. 2006). Diese Effekte könnten durch die Applikation von LPS für die Kontrolltiere sowie die Applikation von LPS und dem 5-Klon-Cocktail für die arthritischen Tiere durchaus gesteigert worden sein, was die erhebliche Gewichtsreduktion und die stärkere physische Belastung in den Gruppen der M₃R-defizienten Tiere erklären könnte.

5.4 Auswirkungen auf die Synovialmembran

Analyse der Synovialmembran allgemein

In den HE-gefärbten Präparaten konnten am Lichtmikroskop massive Unterschiede im Aussehen der SM zwischen den Kontroll- und den CAIA-Tieren festgestellt werden. Bei den erkrankten Mäusen konnten mit unterschiedlichem Ausmaß alle in der Literatur beschriebenen Veränderungen wie Verbreiterung der synovialen Zellschicht, eine Pannusbildung mit Infiltration umliegender Gewebe, eine verstärkte Zellinvasion und das vermehrte Vorkommen von Blutgefäßen mit zum Teil verdickten Gefäßwänden beobachtet werden (Krenn et al. 2012; Zhu et al. 2015). Die Präparate der Kontrollmäuse zeigten bei allen Tieren eine physiologische SM.

Tendenziell zeigten die arthritischen M₃R-defizienten Tiere stärkere pathologische Veränderungen als die WT-CAIA-Mäuse.

Ähnliche Beobachtungen fanden sich auch in der Ultrastrukturanalyse. In den arthritischen Präparaten zeigten die Synoviozyten eine Hypertrophie sowie eine erhebliche Vermehrung von Vakuolen und von endoplasmatischem Retikulum.

Analyse der Blutgefäße

Um die Gefäßveränderungen zu quantifizieren, wurde an Präparaten der CAIA-Tiere ein immunhistochemischer ASMA-Nachweis durchgeführt. Diese wurden daraufhin verblindet und mit einem Score ausgewertet.

Dabei wiesen die arthritischen M₃R-defizienten Tiere eine signifikant stärkere Vermehrung von Gefäßanschnitten, darunter auch verdickte auf als deren Kontrollgruppe. Die Kontrollmäuse der WT-Gruppe zeigten im Gegensatz zu der M₃R-defizienten Kontrollgruppe vermehrt verdickte Gefäße und eine höhere Anzahl von Anschnitten. Dies verstärkte sich durch die Arthritisinduktion hingegen nur leicht.

In anderen Studien wurde gezeigt, dass es bei der RA vermehrt zu einer Gefäßneubildung und zu einem erhöhten Vorkommen im Bereich der SM kommt. Die verstärkte Vaskularisation ermöglicht neben der Versorgung des entzündeten Gebiets mit Sauerstoff und Nährstoffen vor allem die Bildung und Aufrechterhaltung des Pannus (Paleolog 2002). Es gelang der Nachweis, dass das NNCS im Gefäßsystem vertreten ist, unter anderem mit der ChAT. Einem Enzym, welches ACh synthetisiert. Es häufen sich die Hinweise, dass das NNCS in verschiedenen Krankheiten einer Dysregulation unterliegt und somit wesentlich Einfluss auf die Pathogenese dieser nehmen könnte (Kirkpatrick et al. 2001; Beckmann und Lips 2013). Das könnte auch im Fall der RA möglich sein.

In der Literatur wurden die fördernden Wirkungen von Nikotin auf die Angiogeneese, die Gefäßproliferation und die Entstehung der Arteriosklerose besprochen. Dies erfolgt zum Teil über nicht-neuronale nAChR und dies hauptsächlich über den $\alpha 7nAChR$ (Lee und Cooke 2012; Santanam et al. 2012).

Des Weiteren konnte dargestellt werden, dass die muskarinischen Rezeptoren viele Funktionen im Gefäßsystem übernehmen. Dabei entscheidend ist die Art der Zelle, auf welcher der Rezeptor exprimiert und aktiviert wird. Die Aktivierung des M_3R auf Endothelzellen bewirkt eine Gefäßweitstellung, wohingegen der aktivierte M_3R auf den glatten Muskelzellen der Gefäße eine Gefäßverengung verursacht (Harvey 2012).

In der Literatur fanden sich Anhaltspunkte, dass der M_3R Funktionen in der Bildung von glatter Muskulatur übernimmt. So konnte gezeigt werden, dass in M_3R -defizienten Mäusen der Anteil glatter Muskulatur in den Lungengefäßen und dem Gewebe der Atemwege gegenüber WT-Mäusen um bis zu 40% vermindert war (Kistemaker et al. 2014). Diese Ergebnisse decken sich mit den hier beobachteten, allerdings ließ sich der niedrige Score-Wert der M_3R -defizienten Gruppe durch die Arthritisinduktion signifikant steigern.

5.5 Auswirkungen auf die Gelenkknorpelflächen

Analyse des Knorpels allgemein

Die histologische Analyse des Kniegelenkknorpels ergab die für die Arthritis typischen Veränderungen wie eine erodierte Oberfläche, Knorpeldestruktion und Infiltration des Knorpels durch den Pannus. Wie in einer anderen Studie beschrieben, war auch hier zu beobachten, dass die Erosion der Knorpeloberfläche das erste Zeichen einer pathologischen Veränderung war (Tanaka et al. 2016). Sie lag selbst in Präparaten vor, in denen sonst keine Veränderungen in Knorpel und Knochen zu beobachten waren. Allerdings ergab die histologische Analyse des Kniegelenkknorpels keinen signifikanten Unterschied zwischen den arthritischen Gruppen. Der Knorpel beider Kontrolltiergruppen zeigte hingegen durchweg eine physiologische Struktur.

In der Ultrastrukturanalyse fielen die Chondrozyten der M_3R -defizienten Mäuse durch ihren pyknotischen Zellkern und ein verstärktes Vorkommen an Vakuolen im Zytoplasma auf. Diese Veränderungen der Zellstruktur wie die Verdichtung des Chromatins sind aus der Literatur bekannt (Morko et al. 2005).

Analyse des Kollagen II-Nachweis

Kollagen II ist der Hauptbestandteil des hyalinen Gelenknorpels (Dejica et al. 2012) und sorgt unter anderem für dessen Druckelastizität. Bei Knorpeldestruktion wird der entstandene Defekt mit Faserknorpel ersetzt, welcher weniger elastisch, dafür aber zugfester als hyaliner Knorpel ist.

In diesem Experiment fanden sich signifikant größere Kollagen II-negative Knorpelbereiche in der Gruppe der M₃R-defizienten CAIA-Tiere als in der arthritischen WT-Gruppe. Bei der RA wird der Verlust von Kollagen II durch verschiedene Enzyme (Wernicke et al. 1996; Tanaka et al. 2016) und über eine verminderte Kollagen II-Produktion (Rousseau et al. 2004) erklärt. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung des M₃R proliferative Effekte auf die Kollagen II-Synthese in menschlichen Lungenfibroblasten hat (Haag et al. 2008). Hingegen wurde bei M₃R-defizienten Mäusen eine Verminderung der Kollagenablagerungen im Rahmen allergisch obstruktiver Lungenerkrankungen festgestellt (Kistemaker et al. 2014). Der Kollagen II-Verlust in M₃R-defizienten Mäusen könnte durch die verminderte Kollagen II-Produktion in Mäusen, bei welchen CAIA induziert wurde, erklärt werden, was ebenfalls das signifikant höhere Vorkommen von Kollagen II im Knorpel der arthritischen WT-Tiere erklären könnte.

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Studie eine verstärkte messenger-Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression von MMP 13 bei M₃R-defizienten CAIA-Mäusen mit niedrigem Arthritis-Score im Vergleich zu WT-Mäusen aufgefunden werden (Beckmann et al. 2016). Die MMPs können von den synovialen Fibroblasten freigesetzt werden und sind im Krankheitsbild der RA an der Zerstörung der EZM beteiligt (Gravallese et al. 1991; Lee und Weinblatt 2001), was ebenfalls zu dem verminderten Kollagen II-Vorkommen führen könnte.

5.6 Auswirkung auf den subchondralen Knochen

Analyse des Knochens allgemein

Auch im Bereich des Knochens konnten für die Arthritis typische Veränderungen wie Infiltration durch den Pannus, Destruktion des Knochens bis hin zum Knochenverlust bei den erkrankten Versuchsgruppen gesichtet werden. Die Kontrollmäuse beider Gruppen zeigten hingegen durchweg eine physiologische Gestaltung der Knochenstruktur. Bei der Score-Auswertung war eine signifikant höhere Pathologie der Knochen in der Gruppe der M₃R-defizienten CAIA-Tiere im Vergleich zu den WT-CAIA-Tieren auffällig. Dieses Ergebnis lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass der

aktivierte M_3R sich günstig auf den Aufbau von Knochen auswirkt und dessen Abbau hemmt. Da der M_3R sich abschwächend auf die Wirkung des sympathischen Nervensystems auswirkt (Shi et al. 2010). Dieses vermittelt über den beta-2-adrenergen Rezeptor, welcher auf den Osteoblasten exprimiert wird, eine Erhöhung des Knochenabbaus. Dieser Prozess konnte durch die Gabe von Betablockern bei der Osteoporose vermindert werden (Togari et al. 2005). Allerdings finden sich in der Literatur Hinweise, dass im Rahmen der Arthritiserkrankung sowohl die Expression des beta-2-adrenergen Rezeptors als auch die sympathische Innervation vermindert ist (Baerwald et al. 1997; Wahle et al. 2001; Weidler et al. 2005). Daher könnte der Knochenverlust durch die sympathische Aktivität in diesem Modell möglicherweise eine geringere Rolle spielen.

Des Weiteren neigen M_3R -defiziente Mäuse zu einer niedrigeren Dicke und Anzahl von Trabekeln sowie einer reduzierten Knochenmasse im Unterschiede zu WT-Mäusen (Kliemann et al. 2012). Diese verminderte Knochenstruktur erinnert an Knochenerkrankungen wie die Osteoporose. In einer Studie mit osteoporotischen Ratten konnte bei diesen eine Verringerung der M_3R -Expression beobachtet werden und es zeigte sich eine Korrelation zwischen dieser Verringerung und einem Fortschreiten der Osteoporose (Kauschke et al. 2014). Dies könnte unter anderem auch in dem CAIA-Modell die verstärkten Veränderungen im Knochen der M_3R -defizienten Tiere erklären.

Bei der ultrastrukturellen Analyse der Osteozyten zeigten die Tiere der arthritischen M_3R -defizienten Gruppe starke pathologische Veränderungen. Vor einigen Jahren wurde bekannt, dass die Osteozyten über Interaktionen sowohl mit Osteoblasten als auch mit Osteoklasten in Verbindung stehen und somit Einfluss auf den Knochenaufbau und -abbau nehmen können (Schaffler und Kennedy 2012). Dieses System könnte bei den arthritischen M_3R -defizienten Tieren in Mitleidenschaft gezogen worden sein.

Die histologischen Beobachtungen wurden durch weitere Untersuchungen, welche im Rahmen dieser Studie gemacht wurden, unterstützt. So konnte eine erhöhte mRNA-Expression von RANKL und Kathepsin K bei Pfoten von M_3R -defizienten Mäusen bereits bei einem niedrigen Arthritis-Score nachgewiesen werden. Bei den Pfoten der WT-Mäuse hingegen erst bei einem hohen Arthritis-Score (Beckmann et al. 2016). Kathepsin K gehört zu den Endoproteasen. Es wird von synovialen Zellen und vor allem von Osteoklasten gebildet. Es ist an Knochen- und Knorpelabbauvorgängen beteiligt und zeigt ein vermehrtes Vorkommen in Kombination mit proentzündlichen Zytokinen (Hou et al. 2002; Salminen-Mankonen et al. 2007). RANKL wird zum einen auf synovialen B-Zellen exprimiert und regt in der RA eine Verstärkung der

Knochenerosion an (Danks et al. 2016). Zum anderen zeigt er sich auf Vorläuferzellen von Osteoklasten und stimuliert deren Differenzierung (Jones et al. 2002). Des Weiteren konnte in diesem Experiment ein vermehrtes Vorkommen von IL-6, ein entzündungsförderndes Zytokin, und ein erhöhtes Auftreten von infiltrierenden Neutrophilen in den Gelenken beider CAIA-Gruppen beobachtet werden. Wobei die Neurophileninfiltration bei den M₃R-defizienten Tieren etwas stärker ausgeprägt war als bei den arthritischen WT-Mäusen (Beckmann et al. 2016). Neutrophile exprimieren ebenfalls RANKL und scheinen in der RA den erosiven Knochenabbau zu vermitteln (Chakravarti et al. 2009; Dimitrova et al. 2012). Somit könnte die etwas stärkere Entzündungsreaktion bei den M₃R-defizienten CAIA-Mäusen ebenfalls zu der vermehrten Destruktion der Knochen- und Knorpelstrukturen beigetragen haben.

Analyse TRAP-Nachweis

Durch das Auszählen der mehrkernigen TRAP-positiven Zellen konnte gezeigt werden, dass diese signifikant vermehrt in den Präparaten der M₃R-defizienten CAIA-Mäuse im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollmäusen vorkamen. Sie befanden sich verstärkt in Bereichen der Knochenerosion in Nähe des Gelenkspaltes.

In der hier diskutierten Studie konnten neben dem positiven TRAP-Nachweis und der typischen Position der mehrkernigen Zellen weitere Hinweise für das Vorliegen von Osteoklasten gefunden werden. Unter anderem die verstärkte mRNA-Expression von Kathepsin K und RANKL sowie der Nachweis von IL-6 (Beckmann et al. 2016). IL-6 beteiligt sich unter physiologischen Konditionen an Knochenumbauvorgängen sowie an der Differenzierung von Osteoklasten und wird vom synovialen Gewebe freigesetzt (Goldring und Gravallesse 2000). Das verstärkte Vorkommen von RANKL und IL-6 könnte die Rekrutierung, Infiltration und Differenzierung von Osteoklasten fördern.

In anderen Studien wurde ebenfalls beobachtet, dass sich TRAP-positive Zellen oder Osteoklasten verstärkt in den erosiven Knochenbereichen befanden (Leisen et al. 1988; Suzuki et al. 1998; Gravallesse 2002). Ebenso gelang es, im Modell der CIA deren direkte Beteiligung an der Gelenkdestruktion zu zeigen (Suzuki et al. 1998). Damit könnte die erhöhte Anzahl TRAP-positiver Zellen in den arthritischen M₃R-defizienten Tieren die verstärkte Knochenzerstörung mit erklären.

TRAP spielt allerdings nicht nur als enzymhistochemischer Marker eine Rolle, sondern sie reguliert auch wichtige Funktionen im Immunsystem und dem Knochenumbau (Hayman 2008). Als saure Phosphatase kann TRAP skelettale Proteine wie Osteopontin abbauen (Suter et al. 2001), welches unter anderem dem Erhalt der Knochensubstanz und dem Immunsystem dient, aber auch in diversen Tumorarten überexprimiert vorkommt. Es konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass die

beiden Proteine an der gleichen Lokalisation in den Präparaten vorkommen (Hayman und Cox 2004). In einer Studie an Osteopontin-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu den WT-Tieren nach der RA-Induktion eine geringere Gelenkdestruktion und Schwellung, Apoptose der Knorpelzellen sowie eine verminderte Gefäßneubildung zeigten (Yumoto et al. 2002). Das TRAP-Substrat Osteopontin wie auch die TRAP könnten für die Behandlung und Klärung der Pathogenese der RA und anderer entzündlicher Erkrankungen ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen (Hayman 2008; Zhang et al. 2015).

5.7 Die Rolle des NNCS

Seit der Entdeckung des antiinflammatorischen Signalwegs durch Tracey et al. (Borovikova et al. 2000; Rosas-Ballina und Tracey 2009) wurde der $\alpha 7$ -nAChR und seine Rolle in der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen vielseitig erforscht. Derzeit noch wenig erforscht ist hierbei die Funktion der MRs, wobei ihnen eine entzündungsfördernde Wirkung zugeschrieben wird (Fuentes et al. 2008; Zheng et al. 2004). Daher waren die Ergebnisse von dem hier diskutierten Experiment überraschend, da bei den M_3 R-defizienten Tieren eine stärker ausgeprägte Belastung, massivere Knochendestruktion sowie ein vermehrter Kollagen II-Verlust im Vergleich zu den WT-Mäusen zu beobachten war.

Passend zu diesen Erkenntnissen konnte zusätzlich aus Proben dieser Studie eine etwas ausgeprägtere Entzündungsreaktion nach Induktion der Arthritis bei den M_3 R-defizienten Mäusen gezeigt werden. Die Expression von IL-6 und die Anzahl Neutrophiler war in den Gelenken beider CAIA-Gruppen erhöht, dabei war die Zahl neutrophiler Granulozyten bei M_3 R-defizienten Tieren etwas höher (Beckmann et al. 2016). Diese Zellen scheinen entscheidend an der Auslösung der CAIA beteiligt zu sein und eine Minderung ihrer Zahl hat positive Auswirkungen auf die Erkrankung (Nandakumar et al. 2003). Des Weiteren wurde eine verstärkte Induktion der mRNA-Expression von CXCL2, einem Chemoattrakteur für Neutrophile, in den Gelenken beider CAIA-Gruppen gezeigt. Dabei war die Expression bereits in den Pfoten der M_3 R-defizienten Mäuse mit einem niedrigen Arthritis-Score deutlich erhöht. Bei WT-Mäusen war eine erhöhte Expression nur bei einem hohen Arthritis-Score zu zeigen. Die Gesamtzahl zirkulierender Leukozyten insbesondere der Neutrophilen war bei den M_3 R-defizienten CAIA-Tieren im Vergleich zu der WT-CAIA-Gruppe signifikant erhöht. Bei den LPS-Kontrollgruppen verhielten sich die Neutrophilen ähnlich, was ein Hinweis für eine stärkere systemische und entzündungsfördernde Wirkung der LPS-Applikation

in Abwesenheit von M₃R sein könnte. Bei den WT-LPS-Mäusen konnte nur ein lokaler Anstieg in den betroffenen Pfoten der Immunzellen gezeigt werden, jedoch kein systemischer (Beckmann et al. 2016). Eventuell war die Antikörper- und LPS-Dosis zur Arthritisinduktion zu gering, um in den WT-Tieren eine systemische Reaktion auszulösen oder die Werte der systemischen Entzündungsreaktion waren am Ende des Versuchs bereits wieder rückläufig.

Eine Erklärung für den scheinbar proinflammatorischen Effekt der M₃R-Defizienz könnte auf den Wegfall der Aktivierung cholinergischer zentraler M₃Rs zurückzuführen sein. Da gezeigt werden konnte, dass periphere MRs nicht für die Zytokinregulation im Rahmen des antiinflammatorischen Signalwegs benötigt werden. Dafür wurde aber berichtet, dass zentrale MRs eine entzündungshemmende Wirkung ausüben (Langley et al. 2004; Pavlov et al. 2006).

6 Ausblick

In dieser Studie wurde die Frage nach dem Einfluss des M₃R auf die RA experimentell bearbeitet. Es konnte eine verstärkte Gelenkdestruktion in den Bereichen Knochen, Knorpel und SM bei den erkrankten M₃R-defizienten Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen nachgewiesen werden. Hier besteht allerdings weiterer Forschungsbedarf, um die Fragen zu klären, inwieweit die M₃R-Defizienz bzw. -Antagonisierung protektiv auf die komplexen Pathomechanismen und Symptome der RA wirkt und ob diese Erkenntnisse gewinnbringend in den klinischen Alltag eingebracht werden können.

Somit wäre von Interesse, spezifische M₃R-Agonisten zu finden. Diese Selektivität ist wichtig, da es in der Gruppe der muskarinischen Rezeptor-Subtypen große strukturelle Ähnlichkeiten gibt und somit das Auftreten von Nebenwirkungen minimiert werden könnte. In diesem Zusammenhang sollten auch die Strukturen untersucht werden, welche es dem M₃R ermöglichen, mit G-Proteinen zu interagieren. Erste Forschungen zu diesen Themen gab es bereits in den letzten Jahren (Kruse et al. 2014). Allerdings besteht hier weiterer Forschungsbedarf, um die Strukturen und die damit zusammenhängenden Signalkaskaden vollständig zu verstehen, bevor sich hieraus eine protektive Pharmakotherapie entwickeln kann.

Weitere Forschungen zu dem Vorkommen des M₃R in anderen Körpergeweben und die dortige Auswirkung seiner Aktivierung wären günstig, um mögliche medikamentöse Wirkungen einschätzen zu können. Ebenfalls könnte sich hier die denkbare Beteiligung des M₃R an dem Pathomechanismus anderer Erkrankungen zeigen.

7 Zusammenfassung

Die RA ist eine der häufigsten entzündlichen Gelenkerkrankungen und weist einen progredienten und schubweisen Verlauf auf. In der Folge des chronischen Krankheitsgeschehens kommt es bei den Patienten zu Einschränkungen in der Lebensqualität und der Erwerbsfähigkeit. Ebenfalls ist die RA mit einer verkürzten Lebenszeit assoziiert.

Das nicht-neuronale cholinerge System scheint für die Entstehung und den Fortschritt der RA von Bedeutung zu sein. Dabei wurde die Rolle des M_3R in dieser Beziehung noch nicht untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen möglichen Effekt der M_3R -Defizienz bei einer experimentell induzierten Arthritis im Mausmodell zu untersuchen.

Im Rahmen des zehntägigen Versuchs wurde in zwölf Wochen alten $M_3R^{-/-}$ - und WT-Mäusen CAIA ausgelöst. Die Stärke der RA und die Belastung der Tiere wurde durch den kumulativen Arthritis-Score und den Belastungsscore bewertet. Die Kniegelenke der Versuchsgruppen sowie der Kontrolltiere wurden auf histologische Veränderungen in den drei Bereichen Knochen, Knorpel und SM durch histologische Scores, immun- und enzymhistologische Untersuchungen, der Histomorphometrie sowie der TEM analysiert.

Die Auswertung des kumulativen Arthritis-Scores konnte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den M_3R -defizienten und WT-Mäusen aufzeigen, die M_3R -defizienten CAIA-Tiere zeigten allerdings eine signifikante Gewichtsreduktion im Vergleich zu den anderen Gruppen sowie eine höhere Belastung. In den histologischen Auswertungen zeigte sich ein signifikant stärkerer Kollagen II-Verlust bei den $M_3R^{-/-}$ -CAIA Tieren im Vergleich zu den WT-CAIA-Mäusen. Auch der histologische Score für Knochenveränderungen zeigte signifikant vermehrte Destruktionen bei den $M_3R^{-/-}$ -CAIA-Tieren in Bezug zu der WT-CAIA-Gruppe. Enzymhistochemisch konnte mittels TRAP auch ein signifikant gesteigertes Vorkommen von Osteoklasten bei den arthritischen $M_3R^{-/-}$ -Tieren im Vergleich zu den WT-CAIA-Versuchstieren gezeigt werden. Des Weiteren konnte über die ASMA-Färbung bei den arthritischen M_3R -defizienten Tieren anders als bei den WT-CAIA-Tieren eine signifikant erhöhte Anzahl von Gefäßanschnitten gezeigt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen nach, dass die M_3R -Defizienz die Versuchstiere nicht vor der CAIA bewahrte. Die $M_3R^{-/-}$ -CAIA-Tiere zeigten eine tendenziell vermehrte Ausprägung der Symptome als die WT-CAIA-Mäuse und die arthritische Gelenkzerstörung war signifikant stärker ausgeprägt als bei der arthritischen WT-Gruppe. Diese Ergebnisse erlauben die Vermutung, dass die

Stimulation des M₃Rs positive Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf und die Symptomausprägung der RA haben könnte. Allerdings sollten hier entsprechende Nebenwirkungen und Kontraindikationen Beachtung finden.

8 Summary

RA is one of the most common inflammatory joint diseases and has a progressive and intermittent progress. As a result of chronic disease, patients experience limitations in quality of life and ability to work. Also, the RA is associated with a shortened lifetime.

The non-neuronal cholinergic system appears to be important for the genesis and progression of RA. The role of M3R in this regard has not yet been investigated. The aim of the present study was to investigate a possible effect of M3R deficiency in an experimentally induced arthritis in the mouse model.

During the ten-day trial, CAIA was triggered in twelve-week-old M3R^{-/-} and WT mice. The severity of RA and the burden on animals were assessed by cumulative arthritis score and total condition score. The knee joints of the experimental groups as well as the control animals were analyzed for histological changes in the three areas: bone, cartilage and SM by histological scores, immune- and enzyme-histology, cartilage histomorphometry and TEM.

The evaluation of the cumulative arthritis score did not show a statistically significant difference between the M3R deficient and WT mice, but the M3R deficient CAIA animals showed a significant weight reduction compared to the other groups as well as a higher burden. The histological evaluations showed a significantly higher collagen II loss in the M3R^{-/-} CAIA animals compared to the WT CAIA mice. Also, the histological score for bone changes showed significantly increased destruction in the M3R^{-/-} CAIA animals relative to the WT CAIA group. Enzyme histochemically TRAP showed a significantly increased occurrence of osteoclasts in the arthritic M3R^{-/-} animals compared to the WT CAIA experimental animals. Furthermore, the ASMA staining in the arthritic M3R deficient animals compared to the WT CAIA animals showed a significantly increased number of vascular slices.

The results of the present study show that the M3R deficiency did not protect the experimental animals from the CAIA. The M3R^{-/-} CAIA animals showed a more pronounced increase in symptoms than the WT CAIA mice and the arthritis-related joint destruction was significantly more pronounced than in the arthritic WT group. These results suggest that stimulation of the M3R may have a positive effect on RA's disease progression and symptom severity. In this case, particular attention should be given to relevant side effects and contraindications.

9 Abkürzungsverzeichnis

5-Klon-Cocktail	monoklonaler Kollagen-Antikörper-Cocktail
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AcCoA	Acetyl-Coenzym A
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
ALP	Alkalische Phosphatase
Aqua bidest	2 mal destilliertes Wasser
Aqua dest	1 mal destilliertes Wasser
Aqua inj.	Aqua ad injectabilia
ASMA	alpha smooth muscle actin
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	Rinderserum Albumin
CAIA	Kollagen Antikörper-induzierte Arthritis
CarAT	Carnitinacetyltransferase
ChAT	Cholinacetyltransferase
CHT1	Cholintransporter
CIA	Kollagen II-induzierte Arthritis
CTL	Cholin transporter-like
DMARDs	krankheitsmodifizierende antirheumatische Medikamente
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
G-Protein	Guanosintriphosphat-Protein
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämalaun-Eosin
HLA	humane Leukozytenantigene
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharide
LW	Leitungswasser
M ₃ R	muskarinischer 3-Rezeptor

M3R ^{-/-}	M ₃ R-defizient
M3R ^{-/-} -CAIA	M ₃ R-defiziente CAIA-Maus
M3R ^{-/-} -LPS	M ₃ R-defiziente Kontrollmaus
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MR	muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Na	Natrium
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
nAChR	nikotinscher Actylcholin-Rezeptor
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NNCS	non-neuronales cholinerges System
OCTs	organische Kationentransporter
ODF	osteoclast differentiation factor
OsO ₄	Osmiumtetroxid
PAS	Periodic-Acid-Schiff
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RA	rheumatoide Arthritis
RANKL	receptor activator of NF-κB ligand
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SM	Synovialmembran
TBI	Tierstall der Biochemie
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF-Alpha	Tumor-Nekrose-Faktor Alpha
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase

UE	Untereinheit
VACht	vesikulärer Acetylcholintransporter
VEGF	vascular endothelial growth factor
WP	Waschpuffer
WT	Wildtyp
WT-CAIA	Wildtyp-CAIA-Maus
WT-LPS	Wildtyp-Kontrollmaus

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien	18
Tabelle 2: Verwendete Kits	20
Tabelle 3: Verwendete Antikörper.....	20
Tabelle 4: M ₃ R-Primer-Mix	22
Tabelle 5: PCR-Ansatz zur Genotypisierung	22
Tabelle 6: PCR-Programm zur Genotypisierung	22
Tabelle 7: Versuchstierverteilung.....	24
Tabelle 8: Kumulativer Arthritis-Score (nach Irmner et al. 2014)	25
Tabelle 9: Belastungsscore.....	25
Tabelle 10: Histologischer Score zur Beurteilung der Kniegelenke.....	32
Tabelle 11: Histologischer Score zur Quantifizierung ASMA-gefärbter Schnitte.....	33
Tabelle 12: Ergebniszusammenfassung.....	61

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das cholinerge System in non-neuronalen Zellen (modifiziert nach Kummer et al. 2008).....	5
Abbildung 2: Struktur der nAChR (modifiziert nach Gotti und Clementi 2004).....	6
Abbildung 3: Schema der MRs mit Kopplung an die G-Proteine (modifiziert nach Wess et al. 2007).....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung des gesunden und des arthritischen Kniegelenks	15
Abbildung 5: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten der M ₃ R-Genotypisierung.....	23
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der CAIA.....	24
Abbildung 7: Knorpellängenmessung.....	33
Abbildung 8: Kumulativer Arthritis-Score im Versuchsverlauf	36
Abbildung 9: Inzidenz der Arthritis im Versuchsverlauf	36
Abbildung 10: Gewichtsveränderungen der Mäuse über den gesamten Versuchsverlauf	37
Abbildung 11: Belastungsscore im Versuchsverlauf.....	38
Abbildung 12: HE-Färbung, Kniegelenk, Übersicht.....	40
Abbildung 13: HE-Färbung, lateraler Kniegelenksspalt, Vergrößerung aus Abbildung 12	41
Abbildung 15: HE-Färbung, Kniegelenk, Pannus.....	42
Abbildung 16: TEM synovialer Makrophagen (A-Zellen), Kniegelenk.....	43
Abbildung 17: TEM synovialer Fibroblast (B-Zellen), Kniegelenk.....	44
Abbildung 18: Analyse der ASMA-positiven Blutgefäße	45
Abbildung 19: Histopathologischer ASMA-Score	46
Abbildung 20: Alcianblau-PAS-Färbung, Kniegelenk.....	47
Abbildung 21: Alcianblau-PAS-Färbung, Knorpeloberfläche im Kniegelenk.....	48
Abbildung 22: Alcianblau-PAS-Färbung, Kniegelenkdestruktion	49
Abbildung 23: Alcianblau-PAS-Färbung, Pannus.....	49
Abbildung 24: Quantifizierung histopathologischer Veränderung des Knorpels im Kniegelenk	50
Abbildung 25: Immunhistochemischer Kollagen II-Nachweis, Kniegelenk.....	51
Abbildung 26: Quantifizierung des Kollagen II-Verlusts im Kniegelenksknorpel	52
Abbildung 27: TEM von Chondrozyten, Kniegelenk.....	53
Abbildung 28: Toluidinblau-Färbung, Kniegelenk.....	54
Abbildung 29: Toluidinblau-Färbung, Knochendestruktion	55
Abbildung 30: Histologischer Score Knochen.....	56
Abbildung 31: Enzymhistochemischer TRAP-Nachweis, Kniegelenk	57
Abbildung 33: Quantifizierung TRAP- positiver Zellen in den Versuchsgruppen	58
Abbildung 34: Enzymhistochemischer ALP-Nachweis, Femur	58
Abbildung 35: TEM der Osteozyten, Kniegelenk.....	60

12 Literaturverzeichnis

- Akhavani, M. A.; Madden, L.; Buyschaert, I.; Sivakumar, B.; Kang, N.; Paleolog, E. M. (2009): Hypoxia upregulates angiogenesis and synovial cell migration in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis research & therapy* 11 (3), R64. DOI: 10.1186/ar2689.
- Alam, S. M.; Kidwai, A. A.; Jafri, S. R.; Qureshi, B. M.; Sami, A.; Qureshi, H. H.; Mirza, H. (2011): Epidemiology of rheumatoid arthritis in a tertiary care unit, Karachi, Pakistan. In: *The Journal of the Pakistan Medical Association* 61 (2), S. 123–126.
- Al-Bishri, J.; Attar, S. M.; Bassuni, N.; Al-Nofaiey, Y.; Qutbuddeen, H.; Al-Harhi, S.; Subahi, S. (2013): Comorbidity Profile Among Patients with Rheumatoid Arthritis and the Impact on Prescriptions Trend. In: *Clinical Medicine Insights. Arthritis and Musculoskeletal Disorders* 6, S. 11–18. DOI: 10.4137/CMAMD.S11481.
- Albrecht, K.; Krüger, K.; Wollenhaupt, J.; Alten, R.; Backhaus, M.; Baerwald, C. et al. (2014): German guidelines for the sequential medical treatment of rheumatoid arthritis with traditional and biologic disease-modifying antirheumatic drugs. In: *Rheumatology International* 34 (1), S. 1–9. DOI: 10.1007/s00296-013-2848-3.
- Aletaha, D.; Neogi, T.; Silman, A. J.; Funovits, J.; Felson, D. T.; Bingham, C. O. 3rd et al. (2010): 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. In: *Arthritis and rheumatism* 62 (9), S. 2569–2581. DOI: 10.1002/art.27584.
- Andersson, K. (2004): Antimuscarinics for treatment of overactive bladder. In: *The Lancet. Neurology* 3 (1), S. 46–53. DOI: 10.1016/S1474-4422(03)00622-7
- Baerwald, C. G.; Laufenberg, M.; Specht, T.; Wichert, P. von; Burmester, G. R.; Krause, A. (1997): Impaired sympathetic influence on the immune response in patients with rheumatoid arthritis due to lymphocyte subset-specific modulation of beta 2-adrenergic receptors. In: *British journal of rheumatology* 36 (12), S. 1262–1269.
- Bai, A.; Guo, Y.; Lu, N. (2007): The effect of the cholinergic anti-inflammatory pathway on experimental colitis. In: *Scandinavian journal of immunology* 66 (5), S. 538–545. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2007.02011.x.
- Banda, N. K.; Takahashi, K.; Wood, A. K.; Holers, V. M.; Arend, W. P. (2007): Pathogenic complement activation in collagen antibody-induced arthritis in mice requires amplification by the alternative pathway. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (6), S. 4101–4109. DOI: 10.4049/jimmunol.179.6.4101
- Beckmann, J.; Dittmann, N.; Schutz, I.; Klein, J.; Lips, K. S. (2016): Effect of M3 muscarinic acetylcholine receptor deficiency on collagen antibody-induced arthritis. In: *Arthritis research & therapy* 18, 17. DOI: 10.1186/s13075-016-0926-0.
- Beckmann, J.; Lips, K. S. (2013): The non-neuronal cholinergic system in health and disease. In: *Pharmacology* 92 (5-6), S. 286–302. DOI: 10.1159/000355835.
- Beckmann, J.; Schubert, J.; Morhenn, H.; Grau, V.; Schnettler, R.; Lips, K. S. (2015): Expression of choline and acetylcholine transporters in synovial tissue and cartilage of

- patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In: *Cell and tissue research* 359 (2), S. 465–477. DOI: 10.1007/s00441-014-2036-0.
- Bellinger, D. L.; Lorton, D.; Hamill, R. W.; Felten, S. Y.; Felten, D. L. (1993): Acetylcholinesterase staining and choline acetyltransferase activity in the young adult rat spleen. Lack of evidence for cholinergic innervation. In: *Brain, behavior, and immunity* 7 (3), S. 191–204. DOI: 10.1006/brbi.1993.1021.
- Bessis, N.; Decker, P.; Assier, E.; Semerano, L.; Boissier, M. (2017): Arthritis models. Usefulness and interpretation. In: *Seminars in immunopathology* 39 (4), S. 469–486. DOI: 10.1007/s00281-017-0622-4.
- Bodolay, E.; Koch, A. E.; Kim, J.; Szegedi, G.; Szekanecz, Z. (2002): Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 6 (3), S. 357–376. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2002.tb00514.
- Bonaz, B.; Sinniger, V.; Hoffmann, D.; Clarencon, D.; Mathieu, N.; Dantzer, C. et al. (2016): Chronic vagus nerve stimulation in Crohn's disease. A 6-month follow-up pilot study. In: *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 28 (6), S. 948–953. DOI: 10.1111/nmo.12792.
- Borovikova, L. V.; Ivanova, S.; Zhang, M.; Yang, H.; Botchkina, G. I.; Watkins, L. R. et al. (2000): Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. In: *Nature* 405 (6785), S. 458–462. DOI: 10.1038/35013070.
- Brand, David D.; Latham, Kary A.; Rosloniec, Edward F. (2007): Collagen-induced arthritis. In: *Nature protocols* 2 (5), S. 1269–1275. DOI: 10.1038/nprot.2007.173.
- Bratton, B. O.; Martelli, D.; McKinley, M. J.; Trevaks, D.; Anderson, C. R.; McAllen, R. M. (2012): Neural regulation of inflammation. No neural connection from the vagus to splenic sympathetic neurons. In: *Experimental physiology* 97 (11), S. 1180–1185. DOI: 10.1113/expphysiol.2011.061531.
- Buckwalter, J. A. (1995): Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse, and abuse. Experimental studies. In: *The Journal of rheumatology. Supplement* 43, S. 13–15.
- Burr, D. B. (2004): Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis and cartilage / Osteoarthritis Research Society* 12 Suppl A, S. 30. DOI: 10.1016/j.joca.2003.09.016
- Camargo, I. A. de; A. Barros, B. Cipriano; do Nascimento Silveira, M. Sanches; Osorio-de-Castro, C. Garcia Serpa; Guyatt, Gordon; Lopes, L. Cruz (2016): Gap Between Official Guidelines and Clinical Practice for the Treatment of Rheumatoid Arthritis in Sao Paulo, Brazil. In: *Clinical therapeutics*. DOI: 10.1016/j.clinthera.2016.02.020.
- Carlisle, D. L.; Liu, X.; Hopkins, T. M.; Swick, M. C.; Dhir, R.; Siegfried, J. M. (2007): Nicotine activates cell-signaling pathways through muscle-type and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in non-small cell lung cancer cells. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 20 (6), S. 629–641. DOI: 10.1016/j.pupt.2006.07.001.
- Caulfield, M. P.; Birdsall, N. J. (1998): International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Pharmacological reviews* 50 (2), S. 279–290.

Chakravarti, A.; Raquil, M.; Tessier, P.; Poubelle, P. E. (2009): Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. In: *Blood* 114 (8), S. 1633–1644. DOI: 10.1182/blood-2008-09-178301.

Cheng, K.; Shang, A. C.; Drachenberg, C. B.; Zhan, M.; Raufman, J. (2017): Differential expression of M3 muscarinic receptors in progressive colon neoplasia and metastasis. In: *Oncotarget* 8 (13), S. 21106–21114. DOI: 10.18632/oncotarget.15500.

Chernyavsky, A. I.; Arredondo, J.; Wess, J.; Karlsson, E.; Grando, S. A. (2004): Novel signaling pathways mediating reciprocal control of keratinocyte migration and wound epithelialization through M3 and M4 muscarinic receptors. In: *The Journal of cell biology* 166 (2), S. 261–272. DOI: 10.1083/jcb.200401034.

Cohen, N. P.; Foster, R. J.; Mow, V. C. (1998): Composition and dynamics of articular cartilage. Structure, function, and maintaining healthy state. In: *The Journal of orthopaedic and sports physical therapy* 28 (4), S. 203–215. DOI: 10.2519/jospt.1998.28.4.203.

Crowson, C. S.; Matteson, E. L.; Myasoedova, E.; Michet, C. J.; Ernste, F. C.; Warrington, K. J. et al. (2011): The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. In: *Arthritis and rheumatism* 63 (3), S. 633–639. DOI: 10.1002/art.30155.

Danks, L.; Komatsu, N.; Guerrini, M. M.; Sawa, S.; Armaka, M.; Kollias, G. et al. (2016): RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. In: *Annals of the rheumatic diseases* 75 (6), S. 1187–1195. DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-207137.

Darvesh, S.; Hopkins, D. A.; Geula, C. (2003): Neurobiology of butyrylcholinesterase. In: *Nature reviews. Neuroscience* 4 (2), S. 131–138. DOI: 10.1038/nrn1035.

Dayer, J. M.; Beutler, B.; Cerami, A. (1985): Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. In: *The Journal of Experimental Medicine* 162 (6), S. 2163–2168. DOI: 10.1084/jem.162.6.2163

Dejica, V. M.; Mort, J. S.; Lavery, S.; Antoniou, J.; Zukor, D. J.; Tanzer, M.; Poole, A. R. (2012): Increased type II collagen cleavage by cathepsin K and collagenase activities with aging and osteoarthritis in human articular cartilage. In: *Arthritis research & therapy* 14 (3), S. R113. DOI: 10.1186/ar3839.

Di, W. T.; Vergara, F.; Bertiller, E.; Gallardo, M. de Los Angeles; Gandino, I.; Scolnik, M. et al. (2016): Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis in a Health Management Organization in Argentina: A 15-year Study. In: *The Journal of rheumatology*. DOI: 10.3899/jrheum.151262.

Dijkgraaf, L. C.; Bont, L. G. de; Boering, G.; Liem, R. S. (1995): Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism. A review of the literature. In: *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 53 (8), S. 924–929. DOI: 10.1016/0278-2391(95)90283-X

Dimitrova, P.; Ivanovska, N.; Belenska, L.; Milanova, V.; Schwaeble, W.; Stover, C. (2012): Abrogated RANKL expression in properdin-deficient mice is associated with

- better outcome from collagen-antibody-induced arthritis. In: *Arthritis research & therapy* 14 (4), R173. DOI: 10.1186/ar3926.
- Eiden, L. E. (1998): The cholinergic gene locus. In: *Journal of neurochemistry* 70 (6), S. 2227–2240. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1998.70062227.x
- Eyre, D. (2002): Collagen of articular cartilage. In: *Arthritis research* 4 (1), S. 30–35. DOI: 10.1186/ar380.
- Felder, C. C. (1995): Muscarinic acetylcholine receptors. Signal transduction through multiple effectors. In: *official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (8), S. 619–625.
- Feldmann, M.; Brennan, F. M.; Maini, R. N. (1996): Rheumatoid arthritis. In: *Cell* 85 (3), S. 307–310. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81109-5
- Firestein, G. S. (1996): Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? In: *Arthritis and rheumatism* 39 (11), S. 1781–1790.
- Firestein, G. S.; Paine, M. M. (1992): Stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases gene expression in rheumatoid arthritis synovium. In: *The American journal of pathology* 140 (6), S. 1309–1314.
- Flannery, C. R.; Hughes, C. E.; Schumacher, B. L.; Tudor, D.; Aydelotte, M. B.; Kuettner, K. E.; Caterson, B. (1999): Articular cartilage superficial zone protein (SZP) is homologous to megakaryocyte stimulating factor precursor and is a multifunctional proteoglycan with potential growth-promoting, cytoprotective, and lubricating properties in cartilage metabolism. In: *Biochemical and biophysical research communications* 254 (3), S. 535–541. DOI: 10.1006/bbrc.1998.0104.
- Fodale, V.; Santamaria, L. B. (2008): Cholinesterase inhibitors improve survival in experimental sepsis. A new way to activate the cholinergic anti-inflammatory pathway. In: *Critical care medicine* 36 (2), S. 622–623. DOI: 10.1097/CCM.0B013E31816297CE.
- Fuentes, J. M.; Fulton, W. B.; Nino, D.; Talamini, M. A.; Maio, A. De (2008): Atropine treatment modifies LPS-induced inflammatory response and increases survival. In: *Inflammation research* 57 (3), S. 111–117. DOI: 10.1007/s00011-007-7134-y.
- Gabriel, S. E. (2008): Why do people with rheumatoid arthritis still die prematurely? In: *Annals of the rheumatic diseases* 67 Suppl 3, iii30-4. DOI: 10.1136/ard.2008.098038.
- Gautam, D.; Han, S-J; Duttaroy, A.; Mears, D.; Hamdan, F. F.; Li, J. H. et al. (2007): Role of the M3 muscarinic acetylcholine receptor in beta-cell function and glucose homeostasis. In: *Diabetes, obesity & metabolism* 9 Suppl 2, S. 158–169. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2007.00781.x.
- Gautam, D.; Gavrilova, O.; Jeon, J.; Pack, S.; Jou, W.; Cui, Y. et al. (2006): Beneficial metabolic effects of M3 muscarinic acetylcholine receptor deficiency. In: *Cell metabolism* 4 (5), S. 363–375. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.09.008.
- Gautam, D.; Heard, T. S.; Cui, Y.; Miller, G.; Bloodworth, L.; Wess, J. (2004): Cholinergic stimulation of salivary secretion studied with M1 and M3 muscarinic receptor single- and double-knockout mice. In: *Molecular pharmacology* 66 (2), S. 260–267. DOI: 10.1124/mol.66.2.260.

- George, J. A.; Bashir, G.; Qureshi, M. M.; Mohamed, Y. A.; Azzi, J.; al-Ramadi, B. K.; Fernández-Cabezudo, M. J. (2016): Cholinergic Stimulation Prevents the Development of Autoimmune Diabetes. Evidence for the Modulation of Th17 Effector Cells via an IFN γ -Dependent Mechanism. In: *Frontiers in Immunology* 7. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00419.
- Giguère, P. M.; Billard, M. J.; Laroche, G.; Buckley, B. K.; Timoshchenko, R. G.; McGinnis, M. W. et al. (2013): G-protein signaling modulator-3, a gene linked to autoimmune diseases, regulates monocyte function and its deficiency protects from inflammatory arthritis. In: *Molecular immunology* 54 (2), S. 193–198. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.12.001.
- Goldring, S. R.; Gravallesse, E. M. (2000): Mechanisms of bone loss in inflammatory arthritis. Diagnosis and therapeutic implications. In: *Arthritis research* 2 (1), S. 33–37. DOI: 10.1186/ar67.
- Gosens, R.; Zaagsma, J.; Meurs, H.; Halayko, A. J. (2006): Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. In: *Respiratory research* 7, S. 73. DOI: 10.1186/1465-9921-7-73.
- Gotti, C.; Clementi, F. (2004): Neuronal nicotinic receptors. From structure to pathology. In: *Progress in neurobiology* 74 (6), S. 363–396. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2004.09.006.
- Grando, S. A.; Pittelkow, M. R.; Schallreuter, K. U. (2006): Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis. Physiological and clinical significance. In: *The Journal of investigative dermatology* 126 (9), S. 1948–1965. DOI: 10.1038/sj.jid.5700151.
- Grassi, W.; Angelis, R. de; Lamanna, G.; Cervini, C. (1998): The clinical features of rheumatoid arthritis. In: *European journal of radiology* 27 Suppl 1, S. 24.
- Gravallesse, E. M. (2002): Bone destruction in arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 61 Suppl 2, S. 6. DOI: 10.1136/ard.61.suppl_2.ii84
- Gravallesse, E. M.; Darling, J. M.; Ladd, A. L.; Katz, J. N.; Glimcher, L. H. (1991): In situ hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium. In: *Arthritis and rheumatism* 34 (9), S. 1076–1084.
- Gravallesse, E. M.; Manning, C.; Tsay, A.; Naito, A.; Pan, C.; Amento, E.; Goldring, S. R. (2000): Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. In: *Arthritis and rheumatism* 43 (2), S. 250–258. DOI: 10.1002/1529-0131(200002)43:2<250::AID-ANR3>3.0.CO;2-P.
- Grimsholm, O.; Rantapaa-Dahlqvist, S.; Dalen, T.; Forsgren, S. (2008): Unexpected finding of a marked non-neuronal cholinergic system in human knee joint synovial tissue. In: *Neuroscience Letters* 442 (2), S. 128–133. DOI: 10.1016/j.neulet.2008.06.082.
- Gullick, N. J.; Scott, D. L. (2011): Co-morbidities in established rheumatoid arthritis. In: *Best practice & research. Clinical rheumatology* 25 (4), S. 469–483. DOI: 10.1016/j.berh.2011.10.009.

- Haag, S.; Matthiesen, S.; Juergens, U. R.; Racké, K. (2008): Muscarinic receptors mediate stimulation of collagen synthesis in human lung fibroblasts. In: *The European respiratory journal* 32 (3), S. 555–562. DOI: 10.1183/09031936.00129307.
- Harvey, R. D. (2012): Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on cardiovascular function. In: *Handbook of experimental pharmacology* (208), S. 299–316. DOI: 10.1007/978-3-642-23274-9_13.
- Hayman, A. R. (2008): Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. In: *Autoimmunity* 41 (3), S. 218–223. DOI: 10.1080/08916930701694667.
- Hayman, A. R.; Cox, T. M. (2004): Tartrate-resistant acid phosphatase. A potential target for therapeutic gold. In: *Cell biochemistry and function* 22 (5), S. 275–280. DOI: 10.1002/cbf.1133.
- Henderson, B.; Pettipher, E. R. (1985): The synovial lining cell: biology and pathobiology. In: *Seminars in arthritis and rheumatism* 15 (1), S. 1–32. DOI: 10.1016/0049-0172(85)90007-1
- Hirose, J.; Tanaka, S. (2011): [Animal models for bone and joint disease. CIA, CAIA model]. In: *Clinical calcium* 21 (2), S. 253–259.
- Hofer, S.; Eisenbach, C.; Lukic, I. K.; Schneider, L.; Bode, K.; Brueckmann, M. et al. (2008): Pharmacologic cholinesterase inhibition improves survival in experimental sepsis. In: *Critical care medicine* 36 (2), S. 404–408. DOI: 10.1097/01.CCM.0B013E31816208B3.
- Holmdahl, R.; Jansson, L.; Andersson, M. (1986): Female sex hormones suppress development of collagen-induced arthritis in mice. In: *Arthritis and rheumatism* 29 (12), S. 1501–1509. DOI: 10.1002/art.1780291212
- Hou, W.; Li, W.; Keyszer, G.; Weber, E.; Levy, R.; Klein, M. J. et al. (2002): Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. In: *Arthritis and rheumatism* 46 (3), S. 663–674. DOI: 10.1002/art.10114.
- Huston, J. M.; Ochani, M.; Rosas-Ballina, M.; Liao, H.; Ochani, K.; Pavlov, V. A. et al. (2006): Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. In: *The Journal of Experimental Medicine* 203 (7), S. 1623–1628. DOI: 10.1084/jem.20052362.
- Hutamekalin, P.; Saito, T.; Yamaki, K.; Mizutani, N.; Brand, D. D.; Waritani, T. et al. (2009): Collagen antibody-induced arthritis in mice: development of a new arthritogenic 5-clone cocktail of monoclonal anti-type II collagen antibodies. In: *Journal of immunological methods* 343 (1), S. 49–55. DOI: 10.1016/j.jim.2009.01.009.
- Inglis, J. J.; Criado, G.; Medghalchi, M.; Andrews, M.; Sandison, A.; Feldmann, M.; Williams, R. O. (2007): Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen. In: *Arthritis research & therapy* 9 (5), S. R113. DOI: 10.1186/ar2319.
- Irmeler, I. M.; Gebhardt, P.; Hoffmann, B.; Opfermann, T.; Figge, M.; Saluz, H. P.; Kamradt, T. (2014): ¹⁸F-Fluoride positron emission tomography/computed tomography for noninvasive in vivo quantification of pathophysiological bone

metabolism in experimental murine arthritis. In: *Arthritis research & therapy* 16 (4), S. R155. DOI: 10.1186/ar4670.

Jansson, L.; Mattsson, A.; Mattsson, R.; Holmdahl, R. (1990): Estrogen induced suppression of collagen arthritis. V: Physiological level of estrogen in DBA/1 mice is therapeutic on established arthritis, suppresses anti-type II collagen T-cell dependent immunity and stimulates polyclonal B-cell activity. In: *Journal of autoimmunity* 3 (3), S. 257–270. DOI: 10.1016/0896-8411(90)90145-l

Jones, D. Holstead; Kong, Y-Y; Penninger, J. M. (2002): Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 61 Suppl 2, ii32-9. DOI: 10.1136/ard.61.suppl_2.ii32

Jonge, W. J. de; Ulloa, L. (2007): The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. In: *British journal of pharmacology* 151 (7), S. 915–929. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707264.

Kauschke, V.; Lips, K. S.; Heiss, C.; Schnettler, R. (2014): Expression of muscarinic acetylcholine receptors M3 and M5 in osteoporosis. In: *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 20, S. 869–874. DOI: 10.12659/MSM.890217.

Kawashima, K.; Fujii, T.; Moriwaki, Y.; Misawa, H. (2012): Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. In: *Life sciences* 91 (21-22), S. 1027–1032. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.05.006.

Kawashima, K.; Yoshikawa, K.; Fujii, Y. X.; Moriwaki, Y.; Misawa, H. (2007): Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. In: *Life sciences* 80 (24-25), S. 2314–2319. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.02.036.

Khachigian, L. M. (2006): Collagen antibody-induced arthritis. In: *Nature protocols* 1 (5), S. 2512–2516. DOI: 10.1038/nprot.2006.393.

Kirkpatrick, C. J.; Bittinger, F.; Unger, R. E.; Kriegsmann, J.; Kilbinger, H.; Wessler, I. (2001): The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance. In: *Japanese journal of pharmacology* 85 (1), S. 24–28. DOI: 10.1254/jjp.85.24

Kistemaker, L. E. M.; Bos, S. T.; Mudde, W. M.; Hylkema, M. N.; Hiemstra, P. S.; Wess, J. et al. (2014): Muscarinic M₃ receptors contribute to allergen-induced airway remodeling in mice. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 50 (4), S. 690–698. DOI: 10.1165/rcmb.2013-0220OC.

Kliemann, K.; Kneffel, M.; Bergen, I.; Kampschulte, M.; Langheinrich, A. C.; Dürselen, L. et al. (2012): Quantitative analyses of bone composition in acetylcholine receptor M3R and alpha7 knockout mice. In: *Life sciences* 91 (21-22), S. 997–1002. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.07.024.

Koch, A. E. (1998): Review. Angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 41 (6), S. 951–962. DOI: 10.1002/1529-0131(199806)41:6<951::AID-ART2>3.0.CO;2-D.

Koch, A. E.; Harlow, L. A.; Haines, G. K.; Amento, E. P.; Unemori, E. N.; Wong, W. L. et al. (1994): Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial

- function in rheumatoid arthritis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 152 (8), S. 4149–4156.
- Koopman, F. A.; van Maanen, M. A.; Vervoordeldonk, M. J.; Tak, P. P. (2017): Balancing the autonomic nervous system to reduce inflammation in rheumatoid arthritis. In: *Journal of internal medicine* 282 (1), S. 64–75. DOI: 10.1111/joim.12626.
- Koopman, F. A.; Chavan, S. S.; Miljko, S.; Grazio, S.; Sokolovic, S.; Schuurman, P. R. et al. (2016): Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (29), S. 8284–8289. DOI: 10.1073/pnas.1605635113.
- Krenn, V.; Poremba, C.; Dierkes, C. (2012): Biopsieindikationen. Histopathologische Diagnostik in der Rheumatologie. In: *Zeitschrift für Rheumatologie* 71 (4), 297-311; quiz 312-3. DOI: 10.1007/s00393-012-0979-7.
- Kruse, A. C.; Kobilka, B. K.; Gautam, D.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A.; Wess, J. (2014): Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. In: *Nature reviews. Drug discovery* 13 (7), S. 549–560. DOI: 10.1038/nrd4295.
- Kummer, W.; Lips, K. S.; Pfeil, U. (2008): The epithelial cholinergic system of the airways. In: *Histochemistry and cell biology* 130 (2), S. 219–234. DOI: 10.1007/s00418-008-0455-2.
- Langley, R. J.; Kalra, R.; Mishra, N. C.; Sopori, M. L. (2004): Central but not the peripheral action of cholinergic compounds suppresses the immune system. In: *Journal of neuroimmunology* 148 (1-2), S. 140–145. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2003.11.016.
- Lee, D. M.; Weinblatt, M. E. (2001): Rheumatoid arthritis. In: *Lancet (London, England)* 358 (9285), S. 903–911. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)06075-5.
- Lee, J.; Cooke, J. P. (2012): Nicotine and pathological angiogenesis. In: *Life sciences* 91 (21-22), S. 1058–1064. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.06.032.
- Leisen, J. C.; Duncan, H.; Riddle, J. M.; Pitchford, W. C. (1988): The erosive front: a topographic study of the junction between the pannus and the subchondral plate in the macerated rheumatoid metacarpal head. In: *The Journal of rheumatology* 15 (1), S. 17–22.
- Lindblad, S.; Hedfors, E. (1987): The synovial membrane of healthy individuals--immunohistochemical overlap with synovitis. In: *Clinical and Experimental Immunology* 69 (1), S. 41–47.
- Lips, K. S.; Wunsch, J.; Zarghooni, S.; Bschiepfer, T.; Schukowski, K.; Weidner, W. et al. (2007): Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. In: *European urology* 51 (4), S. 1042–1053. DOI: 10.1016/j.eururo.2006.10.028.
- Maia, M.; Vriese, A. de; Janssens, T.; Moons, M.; van Landuyt, K.; Tavernier, J. et al. (2010): CD248 and its cytoplasmic domain: a therapeutic target for arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 62 (12), S. 3595–3606. DOI: 10.1002/art.27701.

- Martelli, D.; McKinley, M. J.; McAllen, R. M. (2014): The cholinergic anti-inflammatory pathway. A critical review. In: *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 182, S. 65–69. DOI: 10.1016/j.autneu.2013.12.007.
- Martel-Pelletier, J.; McCollum, R.; Fujimoto, N.; Obata, K.; Cloutier, J. M.; Pelletier, J. P. (1994): Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 70 (6), S. 807–815.
- Matsumoto, S.; Muller-Ladner, U.; Gay, R. E.; Nishioka, K.; Gay, S. (1996): Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts. In: *The Journal of rheumatology* 23 (8), S. 1345–1352.
- Matthiesen, S.; Bahulayan, A.; Holz, O.; Racke, K. (2007): MAPK pathway mediates muscarinic receptor-induced human lung fibroblast proliferation. In: *Life sciences* 80 (24-25), S. 2259–2262. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.02.027.
- Matthiesen, S.; Bahulayan, A.; Kempkens, S.; Haag, S.; Fuhrmann, M.; Stichnote, C. et al. (2006): Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 35 (6), S. 621–627. DOI: 10.1165/rcmb.2005-0343RC.
- Meurs, H.; Dekkers, B. G. J.; Maarsingh, H.; Halayko, A. J.; Zaagsma, J.; Gosens, R. (2013): Muscarinic receptors on airway mesenchymal cells. Novel findings for an ancient target. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 26 (1), S. 145–155. DOI: 10.1016/j.pupt.2012.07.003.
- Millar, N. S.; Harkness, P. C. (2008): Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (Review). In: *Molecular membrane biology* 25 (4), S. 279–292. DOI: 10.1080/09687680802035675.
- Mor, A.; Abramson, S. B.; Pillinger, M. H. (2005): The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. In: *Clinical immunology* 115 (2), S. 118–128. DOI: 10.1016/j.clim.2004.12.009.
- Morko, J.; Kiviranta, R.; Joronen, K.; Säämänen, A.; Vuorio, E.; Salminen-Mankonen, H. (2005): Spontaneous development of synovitis and cartilage degeneration in transgenic mice overexpressing cathepsin K. In: *Arthritis and rheumatism* 52 (12), S. 3713–3717. DOI: 10.1002/art.21423.
- Mow, V. C.; Ratcliffe, A.; Poole, A. R. (1992): Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. In: *Biomaterials* 13 (2), S. 67–97.
- Muir, H. (1995): The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 17 (12), S. 1039–1048. DOI: 10.1002/bies.950171208.
- Muise, E. D.; Gandotra, N.; Tackett, J. J.; Bamdad, M. C.; Cowles, R. A. (2017): Distribution of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in the murine small intestine. In: *Life sciences* 169, S. 6–10. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.10.030.
- Mulisch, M. and Welsch, U. (2015): *Romeis Mikroskopische Technik*. 19. Auflage: Springer Spektrum.

- Nandakumar, K. S.; Svensson, L.; Holmdahl, R. (2003): Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: description of the disease and the influence of age, sex, and genes. In: *The American journal of pathology* 163 (5), S. 1827–1837. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63542-0.
- Nathanson, N. M. (2000): A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signaling pathways to take your breath away. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12), S. 6245–6247. DOI: 10.1073/pnas.97.12.6245
- Naz, S. M.; Symmons, D. P. M. (2007): Mortality in established rheumatoid arthritis. In: *Best practice & research. Clinical rheumatology* 21 (5), S. 871–883. DOI: 10.1016/j.berh.2007.05.003.
- Paleolog, E. M. (2002): Angiogenesis in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis research* 4 Suppl 3, S. 90. DOI: 10.1186/ar575
- Pap, T.; Claus, A.; Ohtsu, S.; Hummel, K. M.; Schwartz, P.; Drynda, S. et al. (2003): Osteoclast-independent bone resorption by fibroblast-like cells. In: *Arthritis research & therapy* 5 (3), R163-73. DOI: 10.1186%2Far752
- Parvathy, S. S.; Masocha, W. (2013): Gait analysis of C57BL/6 mice with complete Freund's adjuvant-induced arthritis using the CatWalk system. In: *BMC musculoskeletal disorders* 14, S. 14. DOI: 10.1186/1471-2474-14-14.
- Paunovic, V.; Harnett, M. M. (2013): Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for rheumatoid arthritis. In: *Drugs* 73 (2), S. 101–115. DOI: 10.1007/s40265-013-0014-6.
- Pavlov, V. A.; Ochani, M.; Gallowitsch-Puerta, M.; Ochani, K.; Huston, J. M.; Czura, C. J. et al. (2006): Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (13), S. 5219–5223. DOI: 10.1073/pnas.0600506103.
- Pieper, M. P.; Chaudhary, N. I.; Park, J. E. (2007): Acetylcholine-induced proliferation of fibroblasts and myofibroblasts in vitro is inhibited by tiotropium bromide. In: *Life sciences* 80 (24-25), S. 2270–2273. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.02.034.
- Pisitkun, P.; Claudio, E.; Ren, N.; Wang, H.; Siebenlist, U. (2010): The adaptor protein CIKS/ACT1 is necessary for collagen-induced arthritis, and it contributes to the production of collagen-specific antibody. In: *Arthritis and rheumatism* 62 (11), S. 3334–3344. DOI: 10.1002/art.27653.
- Poole, C. A.; Flint, M. H.; Beaumont, B. W. (1987): Chondrons in cartilage. Ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 5 (4), S. 509–522. DOI: 10.1002/jor.1100050406.
- Profita, M.; Di Giorgi, R.; Sala, A.; Bonanno, A.; Riccobono, L.; Mirabella, F. et al. (2005): Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients. In: *Allergy* 60 (11), S. 1361–1369. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00892.x.

- Razani-Boroujerdi, S.; Behl, M.; Hahn, F. F.; Pena-Philippides, J. C.; Hutt, J.; Sopori, M. L. (2008): Role of muscarinic receptors in the regulation of immune and inflammatory responses. In: *Journal of neuroimmunology* 194 (1-2), S. 83–88. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2007.11.019.
- Richardson, C. E.; Morgan, J. M.; Jasani, B.; Green, J. T.; Rhodes, J.; Williams, G. T. et al. (2003): Effect of smoking and transdermal nicotine on colonic nicotinic acetylcholine receptors in ulcerative colitis. In: *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 96 (1), S. 57–65. DOI: 10.1093/qjmed/hcg007
- Rosas-Ballina, M.; Tracey, K. J. (2009): Cholinergic control of inflammation. In: *Journal of internal medicine* 265 (6), S. 663–679. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2009.02098.x.
- Rosas-Ballina, M.; Ochani, M.; Parrish, W. R.; Ochani, K.; Harris, Y. T.; Huston, J. M. et al. (2008): Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (31), S. 11008–11013. DOI: 10.1073/pnas.0803237105.
- Rosas-Ballina, M.; Olofsson, P. S.; Ochani, M.; Valdes-Ferrer, S. I.; Levine, Y. A.; Reardon, C. et al. (2011): Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. In: *Science (New York, N.Y.)* 334 (6052), S. 98–101. DOI: 10.1126/science.1209985.
- Rosler, O. G.; Henss, I.; Thiel, G. (2008): Transcriptional response to muscarinic acetylcholine receptor stimulation. Regulation of Egr-1 biosynthesis by ERK, Elk-1, MKP-1, and calcineurin in carbachol-stimulated human neuroblastoma cells. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 470 (1), S. 93–102. DOI: 10.1016/j.abb.2007.11.008.
- Rousseau, J-C; Zhu, Y.; Miossec, P.; Vignon, E.; Sandell, L. J.; Garnero, P.; Delmas, P. D. (2004): Serum levels of type IIA procollagen amino terminal propeptide (PIIANP) are decreased in patients with knee osteoarthritis and rheumatoid arthritis. In: *Osteoarthritis and cartilage / Osteoarthritis Research Society* 12 (6), S. 440–447. DOI: 10.1016/j.joca.2004.02.004.
- Saamanen, A. K.; Salminen, H. J.; Dean, P. B.; Crombrughe, B. de; Vuorio, E. I.; Metsaranta, M. P. (2000): Osteoarthritis-like lesions in transgenic mice harboring a small deletion mutation in type II collagen gene. In: *Osteoarthritis and cartilage / Osteoarthritis Research Society* 8 (4), S. 248–257. DOI: 10.1053/joca.2000.0298.
- Salminen-Mankonen, H. J.; Morko, J.; Vuorio, E. (2007): Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis. In: *Current drug targets* 8 (2), S. 315–323. DOI: 10.2174/138945007779940188
- Sandberg, G. (1994): Leukocyte mobilization from the guinea pig spleen by muscarinic cholinergic stimulation. In: *Experientia* 50 (1), S. 40–43. DOI: 10.1007/BF01992047
- Santanam, N.; Thornhill, B. A.; Lau, J. K.; Crabtree, C. M.; Cook, C. R.; Brown, K. C.; Dasgupta, P. (2012): Nicotinic acetylcholine receptor signaling in atherogenesis. In: *Atherosclerosis* 225 (2), S. 264–273. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.041.
- Schaffler, M. B.; Kennedy, O. D. (2012): Osteocyte signaling in bone. In: *Current osteoporosis reports* 10 (2), S. 118–125. DOI: 10.1007/s11914-012-0105-4.

Schmitz, N.; Laverty, S.; Kraus, V. B.; Aigner, T. (2010): Basic methods in histopathology of joint tissues. In: *Osteoarthritis and cartilage / Osteoarthritis Research Society* 18 Suppl 3, S. 6. DOI: 10.1016/j.joca.2010.05.026.

Schubert, J.; Beckmann, J.; Hartmann, S.; Morhenn, H.; Szalay, G.; Heiss, C. et al. (2012): Expression of the non-neuronal cholinergic system in human knee synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In: *Life sciences* 91 (21-22), S. 1048–1052. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.04.032.

Score sheets — Justus-Liebig-Universität Gießen (2013). Online verfügbar unter https://www.uni-giessen.de/org/beauftragte/aufgaben/tschbjlu/scoresheet_intern, zuletzt aktualisiert am 27.10.2013, zuletzt geprüft am 30.04.2016.

Scott, D. L.; Wolfe, F.; Huizinga, T. W. J. (2010): Rheumatoid arthritis. In: *Lancet (London, England)* 376 (9746), S. 1094–1108. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60826-4.

Sekhon, H. S.; Keller, J. A.; Proskocil, B. J.; Martin, E. L.; Spindel, E. R. (2002): Maternal nicotine exposure upregulates collagen gene expression in fetal monkey lung. Association with alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 26 (1), S. 31–41. DOI: 10.1165/ajrcmb.26.1.4170.

Shi, Y.; Oury, F.; Yadav, V. K.; Wess, J.; Liu, X. S.; Guo, X. E. et al. (2010): Signaling through the M(3) muscarinic receptor favors bone mass accrual by decreasing sympathetic activity. In: *Cell metabolism* 11 (3), S. 231–238. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.01.005.

Siegel, G. J. (Hg.) (2006): Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. American Society for Neurochemistry. Elsevier Academic. 7. Edition, S. 185-209. Molecular, cellular and medical aspects. S. 185-209. 7th ed. Amsterdam, Boston: Elsevier. Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=189661>.

Slansky, E. Li, J.; Häupl, T.; Morawietz, L.; Krenn, V.; Pessler, F. (2010): Quantitative determination of the diagnostic accuracy of the synovitis score and its components. In: *Histopathology* 57 (3), S. 436–443. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2010.03641.x.

Smith, M.; Barg, E.; Weedon, H.; Papangelis, V.; Smeets, T.; Tak, P. et al. (2003): Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. In: *Annals of the rheumatic diseases* 62 (4), S. 303–307. DOI: 10.1136/ard.62.4.303.

Smolen, J. S.; Landewé, R.; Breedveld, F. C.; Dougados, M.; Emery, P.; Gaujoux-Viala, C. et al. (2010): EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. In: *Annals of the rheumatic diseases* 69 (6), S. 964–975. DOI: 10.1136/ard.2009.126532.

Soder, S.; Aigner, T. (2011): Osteoarthritis. Etiology, typing, staging and histological grading. In: *Der Pathologe* 32 (3), S. 183–192. DOI: 10.1007/s00292-011-1419-1.

Sokka, T.; Abelson, B.; Pincus, T. (2008): Mortality in rheumatoid arthritis: 2008 update. In: *Clinical and experimental rheumatology* 26 (5 Suppl 51), S. 61.

- Suriyo, T.; Thiantanawat, A.; Chaiyaroj, S. C.; Parkpian, P.; Satayavivad, J. (2008): Involvement of the lymphocytic muscarinic acetylcholine receptor in methylmercury-induced c-Fos expression and apoptosis in human leukemic T cells. In: *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 71 (16), S. 1109–1123. DOI: 10.1080/15287390802114725.
- Suter, A.; Everts, V.; Boyde, A.; Jones, S. J.; Lullmann-Rauch, R.; Hartmann, D. et al. (2001): Overlapping functions of lysosomal acid phosphatase (LAP) and tartrate-resistant acid phosphatase (Acp5) revealed by doubly deficient mice. In: *Development (Cambridge, England)* 128 (23), S. 4899–4910.
- Suzuki, Y.; Nishikaku, F.; Nakatuka, M.; Koga, Y. (1998): Osteoclast-like cells in murine collagen induced arthritis. In: *The Journal of rheumatology* 25 (6), S. 1154–1160.
- Symmons, D. P.; Barrett, E. M.; Bankhead, C. R.; Scott, D. G.; Silman, A. J. (1994): The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: results from the Norfolk Arthritis Register. In: *British journal of rheumatology* 33 (8), S. 735–739.
- Tanaka, M.; Yamada, H.; Nishikawa, S.; Mori, H.; Ochi, Y.; Horai, N. et al. (2016): Joint Degradation in a Monkey Model of Collagen-Induced Arthritis: Role of Cathepsin K Based on Biochemical Markers and Histological Evaluation. In: *International journal of rheumatology* 2016, S. 8938916. DOI: 10.1155/2016/8938916.
- Tansey, E. M. (1991): Chemical neurotransmission in the autonomic nervous system. Sir Henry Dale and acetylcholine. In: *Clinical autonomic research : official journal of the Clinical Autonomic Research Society* 1 (1), S. 63–72. DOI: 10.1007/BF01826060
- Telhag, H.; Havdrup, T. (2009): Nucleic Acids in Articular Cartilage from Rabbits of Different Ages. In: *Acta Orthopaedica Scandinavica* 46 (2), S. 185–189. DOI: 10.3109/17453677508989206.
- Terato, K.; Harper, D. S.; Griffiths, M. M.; Hasty, D. L.; Ye, X. J.; Cremer, M. A.; Seyer, J. M. (1995): Collagen-induced arthritis in mice: synergistic effect of E. coli lipopolysaccharide bypasses epitope specificity in the induction of arthritis with monoclonal antibodies to type II collagen. In: *Autoimmunity* 22 (3), S. 137–147.
- Thier, S.; Tonak, M. (2017): Influence of Synovial Fluid on Lubrication of Articular Cartilage in Vitro - A Review. In: *Zeitschrift fur Orthopadie und Unfallchirurgie*. DOI: 10.1055/s-0043-117959.
- Togari, A.; Arai, M.; Kondo, A. (2005): The role of the sympathetic nervous system in controlling bone metabolism. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 9 (5), S. 931–940. DOI: 10.1517/14728222.9.5.931.
- Tracey, K. J. (2002): The inflammatory reflex. In: *Nature* 420 (6917), S. 853–859. DOI: 10.1038/nature01321.
- Tsuji, M.; Hirakawa, K.; Kato, A.; Fujii, K. (2000): The possible role of c-fos expression in rheumatoid cartilage destruction. In: *The Journal of rheumatology* 27 (7), S. 1606–1621.
- Tucek, S. (1982): The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. In: *The Journal of physiology* 322, S. 53–69. DOI: 10.1113/jphysiol.1982.sp014022

- Veale, D. J.; Fearon, U. (2006): Inhibition of angiogenic pathways in rheumatoid arthritis. Potential for therapeutic targeting. In: *Best practice & research. Clinical rheumatology* 20 (5), S. 941–947. DOI: 10.1016/j.berh.2006.05.004.
- Vincelette, J.; Xu, Y.; Zhang, L.; Schaefer, C. J.; Vergona, R.; Sullivan, M. E. et al. (2007): Gait analysis in a murine model of collagen-induced arthritis. In: *Arthritis research & therapy* 9 (6), S. R123. DOI: 10.1186/ar2331.
- Wahle, M.; Kölker, S.; Krause, A.; Burmester, G. R.; Baerwald, C. G. (2001): Impaired catecholaminergic signalling of B lymphocytes in patients with chronic rheumatic diseases. In: *Annals of the rheumatic diseases* 60 (5), S. 505–510. DOI: 10.1136/ard.60.5.505
- Waldburger, J.; Boyle, D. L.; Pavlov, V. A.; Tracey, K. J.; Firestein, G. S. (2008): Acetylcholine regulation of synoviocyte cytokine expression by the alpha7 nicotinic receptor. In: *Arthritis and rheumatism* 58 (11), S. 3439–3449. DOI: 10.1002/art.23987.
- Wang, H.; Yu, M.; Ochani, M.; Amella, C. A.; Tanovic, M.; Susarla, S. et al. (2003): Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. In: *Nature* 421 (6921), S. 384–388. DOI: 10.1038/nature01339.
- Weidler, C.; Holzer, C.; Harbuz, M.; Hofbauer, R.; Angele, P.; Schölmerich, J.; Straub, R. H. (2005): Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. In: *Annals of the rheumatic diseases* 64 (1), S. 13–20. DOI: 10.1136/ard.2003.016154.
- Welsch, U. und Mulisch, M. (2010): Romeis Mikroskopische Technik: Spektrum Akademischer Verlag. ISBN-10: 3827416760
- Wernicke, D.; Seyfert, C.; Hinzmann, B.; Gromnica-Ihle, E. (1996): Cloning of collagenase 3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In: *The Journal of rheumatology* 23 (4), S. 590–595.
- Wess, J. (1996): Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Critical reviews in neurobiology* 10 (1), S. 69–99.
- Wess, J.; Eglen, R. M.; Gautam, D. (2007): Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. In: *Nature reviews. Drug discovery* 6 (9), S. 721–733. DOI: 10.1038/nrd2379.
- Wessler, I.; Kirkpatrick, C. J. (2008): Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. In: *British journal of pharmacology* 154 (8), S. 1558–1571. DOI: 10.1038/bjp.2008.185.
- Wessler, I.; Kirkpatrick, C. J.; Racke, K. (1998): Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems. Expression and function in humans. In: *Pharmacology & therapeutics* 77 (1), S. 59–79. DOI: 10.1016/S0163-7258(97)00085-5
- Wessler, I.; Roth, E.; Deutsch, C.; Brockerhoff, P.; Bittinger, F.; Kirkpatrick, C. J.; Kilbinger, H. (2001): Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. In: *British journal of pharmacology* 134 (5), S. 951–956. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704335.

- Westman, M.; Engstrom, M.; Catrina, A. I.; Lampa, J. (2009): Cell specific synovial expression of nicotinic alpha 7 acetylcholine receptor in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. In: *Scandinavian journal of immunology* 70 (2), S. 136–140. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2009.02266.x.
- Winslow, B. T.; Onysko, M. K.; Stob, C. M.; Hazlewood, K. A. (2011): Treatment of Alzheimer disease. In: *American family physician* 83 (12), S. 1403–1412.
- Wolf-Johnston, A. S.; Hanna-Mitchell, A. T.; Buffington, C. A.; Shinde, S.; Roppolo, J. R.; Mayer, E.; Birder, L. A. (2012): Alterations in the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in esophageal epithelium. In: *Life sciences* 91 (21–22), S. 1065–1069. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.04.028.
- Wu, Y.; Stoddart, M. J.; Wuertz-Kozak, K.; Grad, S.; Alini, M.; Ferguson, S. J. (2017): Hyaluronan supplementation as a mechanical regulator of cartilage tissue development under joint-kinematic-mimicking loading. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 14 (133). DOI: 10.1098/rsif.2017.0255.
- Xu, Z.; Yang, K.; Xu, G.; Zhu, L.; Hou, L.; Zhang, W. et al. (2012): Role of M3 mAChR in in vivo and in vitro models of LPS-induced inflammatory response. In: *International immunopharmacology* 14 (3), S. 320–327. DOI: 10.1016/j.intimp.2012.07.020.
- Yamada, M.; Miyakawa, T.; Duttaroy, A.; Yamanaka, A.; Moriguchi, T.; Makita, R. et al. (2001): Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. In: *Nature* 410 (6825), S. 207–212. DOI: 10.1038/35065604.
- Young, A.; Koduri, G. (2007): Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. In: *Best practice & research. Clinical rheumatology* 21 (5), S. 907–927. DOI: 10.1016/j.berh.2007.05.007.
- Yu, D. H.; Yi, J. K.; Park, S. J.; Kim, M. O.; Kim, H. J.; Yuh, H. S. et al. (2012): Tissue-specific expression of human calcineurin-binding protein 1 in mouse synovial tissue can suppress inflammatory arthritis. In: *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 32 (1), S. 6–11. DOI: 10.1089/jir.2010.0155.
- Yumoto, K.; Ishijima, M.; Rittling, S. R.; Tsuji, K.; Tsuchiya, Y.; Kon, S. et al. (2002): Osteopontin deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (7), S. 4556–4561. DOI: 10.1073/pnas.052523599.
- Zhang, F.; Luo, W.; Li, Y.; Gao, S.; Lei, G. (2015): Role of osteopontin in rheumatoid arthritis. In: *Rheumatology International* 35 (4), S. 589–595. DOI: 10.1007/s00296-014-3122-z.
- Zheng, H.; Chen, D.; Zhang, J.; Tian, Y. (2004): Involvement of M3 cholinergic receptor signal transduction pathway in regulation of the expression of chemokine MOB-1, MCP-1 genes in pancreatic acinar cells. In: *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences* 24 (2), 140-3, 157.
- Zhu, L.; Li, J.; Guo, L.; Yu, X.; Wu, D.; Luo, L. et al. (2015): Activation of NALP1 inflammasomes in rats with adjuvant arthritis; a novel therapeutic target of

carboxyamidotriazole in a model of rheumatoid arthritis. In: *British journal of pharmacology* 172 (13), S. 3446–3459. DOI: 10.1111/bph.13138.

Zimmer, H. (2006): Otto Loewi and the chemical transmission of vagus stimulation in the heart. In: *Clinical cardiology* 29 (3), S. 135–136. DOI: 10.1002/clc.4960290313

Zvaifler, N. J.; Firestein, G. S. (1994): Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 37 (6), S. 783–789. DOI: 10.1002/art.1780370601

13 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

Beckmann, Janet; Dittmann, Nicole; Schutz, Iris; Klein, Jochen; Lips, Katrin Susanne, 2016

Effect of M3 muscarinic acetylcholine receptor deficiency on collagen antibody-induced arthritis.

Arthritis research & therapy 18, 17.

Postervortrag

Von-Behring-Röntgen-Symposium 2015, Gießen

Deficiency of M3 muscarinic receptor aggravates joint destructive effects in murine collagen-antibody-induced arthritis

Nicole Dittmann, Janet Beckmann, Iris Schütz, Jochen Klein, Katrin Susanne Lips

14 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

15 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß für die Ermöglichung dieser Arbeit in seinem Labor für experimentelle Unfallchirurgie bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. K. S. Lips für die außergewöhnliche Unterstützung im gesamten Verlauf des Experimentes sowie bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Außerdem möchte ich ihr an dieser Stelle für die stets zeitnahen, hilfreichen Antworten, die unbezahlbaren Anregungen und für die freundliche, motivierende Zusammenarbeit herzlichst danken.

Frau Dr. Janet Bachmann danke ich für ihre maßgebliche Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung des Experiments sowie die Hilfe bei sämtlichen Fragen zu dieser Arbeit. Die jederzeit freundschaftliche und hilfsbereite Betreuung hat so einiges erheblich erleichtert, dafür vielen Dank.

Des Weiteren möchte ich mich für die wertvolle Einarbeitung in die Laborarbeit sowie die Hilfe bei der Lösung der vielen kleinen und großen Probleme bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Labors für experimentelle Unfallchirurgie in Gießen bedanken. Im Besonderen gilt mein Dank Frau Ida Oberst, Herrn Rainer Braun, Frau Annette Stengel, Frau Vivien Kauschke, Frau Olga Dakischew, Frau Martina Fink, Frau Iris Schütz, Frau Dr. Ursula Sommer, Frau Ivonne Bergen und Frau Sabine Stötzel für die angenehme und produktive Zeit.

Nicht zuletzt gilt mein herzlichster Dank meiner Familie und meinem Freund, erst ihre Unterstützung hat diese Arbeit mit ermöglicht.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**