

**Designermoleküle hemmen die Semaphorin 3F
Wirkung in vitro, haben aber keinen Einfluss auf
den Verlauf der experimentellen Arthritis.**



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der naturwissenschaftlichen Fakultät IV für Chemie und Pharmazie

der Universität Regensburg

Vorgelegt von

Julia Kunath

aus Speyer

im Mai 2016

Promotionsgesuch eingereicht am:

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Jörg Heilmann (Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg) in Kooperation mit Prof. Dr. Rainer Straub (Labor für experimentelle Rheumatologie und Neuroendokrinoimmunologie, Universitätsklinikum Regensburg).

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Rheumatoide Arthritis	1
1.1.1 Pathologie und Pathogenese	2
1.1.2 Diagnostik	4
1.1.3 Therapie	4
1.2 Das periphere Nervensystem und Entzündung	8
1.2.1 Das periphere Nervensystem	8
1.2.2 Der Sympathikus in der Entzündung	9
1.3 Axonale Wegfindung	12
1.3.1 Netrine, Slits und Ephrine	13
1.3.2 Semaphorine	13
1.3.3 Morphogene und Neurotrophine	18
1.4 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Materialien	20
2.1.1 Geräte	20
2.1.2 Chemikalien	21
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.4 Antikörper, Proteine und Peptide	23
2.1.5 Medien und Puffer	25
2.2 Patienten	26
2.3 Mäuse	27

2.4	Gewinnung sympathischer Ganglien für in vitro Repulsionsversuche	27
2.4.1	Ausbau sympathischer Ganglien	27
2.4.2	Repulsionsassay	28
2.5	Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis	30
2.6	Phage display	31
2.6.1	Phage display Übersicht	31
2.6.2	Blockende Peptide aus Phage display	34
2.7	Nachweis und Bestimmung der Bindungseigenschaften der Peptide	35
2.7.1	ELISA mit Anti-Plexin A2/ Semaphorin 3 F/Neuropilin-2 Coating	35
2.7.2	ELISA mit Peptid Coating	36
2.8	Herstellung humaner induzierter Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen	38
2.8.1	Gewinnung von Stammzellen aus Fettgewebe	38
2.8.2	Differenzierung zu induzierten Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen	38
2.9	Nachweis von Plexin A2 und Neuropilin-2 auf induzierten Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen	40
2.10	Herstellung einer transgenen Neuropilin-2/eGFP Maus	41
2.10.1	Allgemeines Prinzip und Zuchtziel	41
2.10.2	Genotypisierung der Mäuse mittels PCR	43
2.11	Statistik	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Vorarbeiten: Bedingungen für den Repulsionsassay	47
3.2	Polyklonale Antikörper gegen Plexin A2 und Neuropilin-2 im Repulsionsassay	49
3.3	Polyklonale Antikörper gegen Plexin A2 und Neuropilin-2 im Kollagen-induzierten Arthritis Mausmodell	50

3.4	Blockende Peptide aus dem Phage display	53
3.4.1	Plexin A2 Protein	54
3.4.2	Neuropilin-2 Protein	57
3.4.3	Anti-Plexin A2 Antikörper	59
3.5	Blockende Peptide im Repulsionsassay	64
3.5.1	Semaphorin 3F Analoga AV1 und AV2 im Repulsionsassay	65
3.5.2	Plexin A2 Analoga AcBl ₃ und AcBl ₄ im Repulsionsassay	66
3.6	Bindungsfähigkeit und Nachweisbarkeit der Peptide	67
3.6.1	Bindung von AcBl ₃ und AcBl ₄ an Semaphorin 3F und Neuropilin-2	67
3.6.2	Nachweis von AcBl ₃ und AcBl ₄ im Mausserum	70
3.7	Einfluss von VEGF 165 auf den Nervenfaserrückzug	73
3.8	Humane, induzierte, Tyrosinhydroxylase-positive Zellen	74
3.8.1	Nachweis von Plexin A2 und Neuropilin-2 auf humanen, induzierten, Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen	74
3.8.2	Humane, induzierte, Tyrosinhydroxylase-positiv ausdifferenzierte Zellen im Repulsionsassay	77
4	Diskussion	78
4.1	Methoden zum Hemmen der Plexin A2 / Neuropilin-2 Signaltransduktion	78
4.1.1	<i>In vitro</i> Ergebnisse aus dem Repulsionsassay	78
4.1.2	<i>In vivo</i> Ergebnisse aus dem Kollagen-induzierten Arthritis Mausmodell	79
4.2	Die transgene Neuropilin-2/eGFP Maus	84
4.3	Plexin A2/ Neuropilin-2 Rezeptor auf humanen, Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen	84
5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis	88

7	Danksagung	98
8	Eidesstattliche Erklärung	99

Abkürzungsverzeichnis

cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
ASC	Adipöse Mesenchymale Stammzellen
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CAM	<i>Cell adhesion molecules</i>
CCP	Zyklisches citrulliniertes Peptid
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cfu	<i>Colony-forming unit</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene related peptide</i>
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankungen
cDMARD	<i>Chemical disease modulating antirheumatic drug</i>
bDMARD	<i>Biological disease modulating antirheumatic drug</i>
DEPEC	Diethylpyrocarbonat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonuclein Säure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FGF8	<i>Fibroblast growth factor 8</i>
Flp	Flippase
FRT	<i>Flippase recognition target</i>
GAP	GTPase aktivierendes Protein

GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
HPA Achse	Hypothalamus–Hypophysen–Nebennieren Achse
HRP	Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
JAK	Januskinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Mical	Mit CasL interagierendes Molekül
MMP	Matrixmetalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
mTor	<i>Mechanistic/ mammalian Target of Rapamycin</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NSAR	Nicht steroidales Antirheumatikum
OA	Osteoarthritis, Arthrose
PAK	p21-aktivierte Kinase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid 3 Kinase
PNS	Peripheres Nervensystem
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
RANKL	Rezeptor Aktivator des NF- κ B Liganden
Ras	G- Protein, Rattensarkom

Rho	Ras homolog
RND1	Rho Familie der GTPasen
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SNS	Sympathisches Nervensystem
SPF	Spezifisch pathogenfrei
SyK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TBS	Tris-gepufferte Lösung
TH	Tyrosinhydroxylase
TMB	Tetramethylbenzidin
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Trk	Tyrosinkinase Rezeptor
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Wnt	Wingless + Int Gen aus Drosophila und Maus
eYFP	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Das Paradebeispiel für rheumatische Erkrankungen ist die rheumatoide Arthritis. Früher wurde sie auch chronische Polyarthritis genannt. Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch verlaufende systemische Autoimmunerkrankung. In der Regel beginnt die RA mit einer Entzündung der peripheren Gelenke. Schmerz, Schwellung und eine morgendliche Steifigkeit sind die Symptome, mit denen die meisten Patienten erstmals konfrontiert werden. Die Entzündungsvorgänge in den Gelenken (Synovitis) führen im weiteren Verlauf der Krankheit zu einer weitgehenden Zerstörung der betroffenen Gelenke [Müller-Ladner U, 2007; Firestein GS, 2003]. Die RA tritt bei ca. 1% der Bevölkerung weltweit auf. Betroffen sind dabei Frauen ab dem 30. bis 50. Lebensjahr mehr als doppelt so häufig wie Männer [Müller-Ladner U, 2007; Theis KA, 2007]. Die betroffenen Personen erfahren durch die RA einen gravierenden Einschnitt in ihre persönliche Lebensqualität und ihre berufliche Leistungsfähigkeit. Die RA bedeutet somit nicht nur eine Einschränkung in Beruf und Familie für den Patienten, sondern hat auch volkswirtschaftliche Konsequenzen [Theis KA, 2007; McInnes IB, 2011].

Die Gelenke sind zwar meist die ersten aber nicht die einzigen betroffenen Stellen. Im Verlauf der Krankheit gibt es zahlreiche systemische Manifestationen. Zum einen betreffen die autoimmunologischen Prozesse im weiteren Verlauf nicht nur die Gelenke, sondern können auch Muskeln, Bindegewebe und andere Organe betreffen [Müller-Ladner U, 2007; McInnes IB, 2011]. Zum anderen sind mit der RA auch andere Krankheiten wie kardiovaskuläre Ereignisse (CVD) oder respiratorische Erkrankungen verknüpft. Lange Zeit glaubte man, dass die RA nicht tödlich sei. Mittlerweile ist bekannt, dass bei Patienten das Risiko an kardiovaskulären oder respiratorischen Erkrankungen zu versterben, nahezu dreimal so hoch ist wie in der restlichen Bevölkerung [Sparks JA, 2015]. Die Schwere der Erkrankung korreliert deutlich mit der erhöhten Sterblichkeit [Goodson NJ, 2011].

Durch diese Erkenntnis kam es auch zu einem Paradigmenwechsel in der Therapie. Hat man früher eher abwartend reagiert, so wird heute eine frühzeitige, aggressive Therapie beim ersten Auftreten der Symptome angestrebt [Gross WL, 2009].

1.1.1 Pathologie und Pathogenese

Die Ursache der RA ist bisher noch ungeklärt, man hat aber im Laufe der Zeit einige Faktoren gefunden, die das Entstehen der Krankheit begünstigen. Man unterscheidet hierbei auslösende und beitragende Faktoren.

Als eine rheumatoide Arthritis auslösend wurden Infektionen mit verschiedenen Bakterien und Viren gefunden. So wird vermutet, dass die Hitze-Schock-Proteine aus Mycobakterien ein kreuzreaktives Epitop haben das zur Entstehung der RA beiträgt. Zusätzlich wird eine Ähnlichkeit zwischen den DNA Sequenzen von Bakterien wie *Escherichia coli* und *Proteus mirabilis* und dem HLA-DRB1 *shared epitop*, auf das später noch eingegangen wird, als möglicher Auslöser gesehen.

Bei den Viren ist das Epstein-Barr Virus ein möglicher Trigger bei rheumatoider Arthritis. Es wurde sehr häufig in erkrankten Gelenken nachgewiesen. Und man weiß, dass es die Proliferation autoantikörperbildender B-Zellen induzieren kann [Carty SM, 2003]. Auch werden Traumata und psychische Stresssituationen als Auslöser angesehen [Hermann M, 2000].

Beitragend zur Entstehung und Schwere der RA sind bestimmte Allele des humanen Leukozyten Antigens (HLA-DRB1). Dieses Gen codiert MHC Klasse II Moleküle, die an den antigenpräsentierenden Zellen zu finden sind und der Erkennung der Antigene durch die CD4+ T-zellen dienen [Firestein GS, 2003; Pratt AG, 2015]. Alle Allele die mit der rheumatoiden Arthritis assoziiert sind, haben an einer Stelle eine ähnliche Aminosäuresequenz, die daher als *shared epitop* bezeichnet wird. Man weiß, dass Menschen, die die Allele HLA-DRB1*0401 oder HLA-DRB1*0404 tragen, ein deutlich höheres Risiko haben, früher und schwerer an RA zu erkranken. Andererseits gibt es weitere HLA-DRB1 Allele, die sich protektiv auswirken. Dieser Zusammenhang besteht allerdings nur bei Patienten, bei denen Antikörper gegen zyklisch citrullinierte Proteine (CCP) nachgewiesen werden können. Citrullinierung von Proteinen oder Peptiden ist eine enzymatische Deaminierung von Arginin zu Citrullin, die eine posttranslationale Konformationsänderung zur Folge hat. Dies ist ein eigentlich physiologischer Vorgang, bei dem es bei RA allerdings zu einem Toleranzbruch kommen kann [Gross WL, 2009; Gonzales-Guy MA, 2002; deVries RR, 2005].

Das klinische Bild der rheumatoiden Arthritis ist aber in erster Linie durch eine autoentzündliche Reaktion, die zu einer Synovitis führt, gegeben. Die gängige Arbeitshypothese besagt, dass es durch ein auslösendes Antigen zu einer Fehlleistung des Immunsystems kommt und das Antigen mithilfe Antigen-präsentierender Zellen von den CD4+T-Lymphozyten erkannt wird.

Ob es zu dieser Reaktion kommt, hängt stark von der Art des MHC Moleküls der antigenpräsentierenden Zelle ab. Diese aktivierten T-Zellen wandern in die Gelenke, proliferieren dort und starten das Entzündungsgeschehen [Karouzakis E, 2006].

Als Folge werden von T-Zellen und anderen aktivierten Zellen, wie Makrophagen und Fibroblasten, proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interferon γ (INF γ) Interleukin-2 (IL-2) und IL-6 ausgeschüttet. Hierdurch kommt es zur Anlockung und Aktivierung von B-Zellen, Makrophagen und neutrophiler Granulozyten, die wiederum durch die Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine und Chemokine das Entzündungsgeschehen weiter anheizen. Die Menge der durch T-Zellen produzierten entzündlichen Zytokine entspricht allerdings in keiner Weise der in anderen Autoimmunerkrankungen nachgewiesenen Mengen. Dieses Phänomen wird dadurch erklärlich, dass auch das Synovium an der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen beteiligt ist. Fibroblasten schütten IL-8 und IL-6 zusätzlich aus und halten so das lokale Entzündungsgeschehen auf hohem Niveau [Firestein GS, 2003]. Außerdem scheinen die T-Zellen einen anergen Phänotyp zu besitzen.

Gleichzeitig wird das Gleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren verschoben. Es kommt zu einem Überschießen der wachstumsfördernden Substanzen wie dem Endothelwachstumsfaktor (VEGF) und somit zur Bildung neuer Blutgefäße [Taylor PC, 2005]. In diesem Milieu werden auch Osteoklasten und synoviale Fibroblasten aktiviert, die durch Matrixmetalloproteinasen (MMP) und Kathepsine zum Abbau des Knorpels beitragen [Müller-Ladner U, 2007; Neumann E, 2004]. Es werden sogar zusätzlich vermehrt Osteoklasten aus Monozyten gebildet. Dies geschieht durch die vermehrte Ausschüttung des *Receptors Activator of NF κ B Ligand* (RANKL). So gerät das System immer mehr aus dem Gleichgewicht und die Entzündung wird chronisch. Ein Teufelskreis beginnt.

Durch das Einwandern der Immunzellen in die eigentlich zellarme Synovia und die Hyperplasie der Synovialzellen entsteht ein charakteristisches histologisches Merkmal, der sogenannte Pannus [Karouzakis E, 2006].

1.1.2 Diagnostik

Man ist heutzutage bemüht, die rheumatoide Arthritis frühzeitig zu erkennen und so den Teufelskreis aus chronischer Entzündung und späterer Gelenkzerstörung zu unterbrechen. Trotz der vielseitigen Therapiemöglichkeiten ist aber nach wie vor nur eine Remission der Krankheit möglich.

Für den frühzeitigen Einsatz von Therapeutika ist allerdings eine rechtzeitige Diagnose unablässig. Die klinische Symptomatik prägt die Diagnose. Sie wird vom Labor unterstützt.

Es werden daher im Labor Rheumafaktoren, das sind gegen den Fc-Teil von IgGs gerichtete Antikörper, die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und das C-reaktive Protein getestet. Diese drei Marker zeigen zwar eine Entzündung zuverlässig an, sind aber leider nicht spezifisch für die RA. In neuerer Zeit wird daher ein Test auf anti-CCP Antikörper hinzugenommen. Dadurch kann eine RA im frühen Stadium mit einer Spezifität von bis 98% nachgewiesen werden [Zampeli E 2015]. Man weiß, dass anti-CCP Antikörper mit einer raschen Erosion der Gelenke einhergehen. Daher ist dieser Serummarker ein wichtiges Werkzeug in der rechtzeitigen Erkennung der schweren rheumatoiden Arthritis [Zampeli E 2015].

Im späteren Verlauf der Krankheit kommen dann auch bildgebende Verfahren, in der Regel Röntgen und MRT hinzu, mit denen man den Pannus und die subchondrale Osteoporose bzw. Entzündung darstellen kann.

1.1.3 Therapie

Ziel der heutigen Therapie ist eine frühzeitige und langfristige Reduktion der Entzündungsreaktion, um eine Gelenkzerstörung weitestgehend zu minimieren. Darüber hinaus ist eine effektive Schmerztherapie von hoher Bedeutung.

Es stehen heutzutage verschiedene molekulare Möglichkeiten zur Verfügung, um in das Krankheitsgeschehen der RA einzugreifen.

Es stehen drei Wirkstoffgruppen zur Verfügung. Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR), Glucocorticoide und krankheitsmodifizierende Antirheumatika (DMARD), die man wiederum in chemische Substanzen und *Biologicals* unterteilt.

Für die Langzeittherapie kommen Glucocorticoide nur in niedrigen Dosen in Frage. Sie können das Entzündungsgeschehen in der RA zwar positiv beeinflussen, sind aber bei hohen Dosen wegen Nebenwirkungen wie Haut- und Muskelatrophie, Cushing-Syndrom, Katarakt und Osteoporose sehr problematisch. NSARs haben auf Entzündung bei der rheumatoiden Arthritis nur ungenügenden Einfluss, sind aber wegen ihrer schmerzlindernden Wirkung häufig als Co-Medikation zu finden [vanVollenhoven RF, 2009].

Die aktuelle Therapieempfehlung der EULAR ist in Abbildung 1 vereinfacht dargestellt.

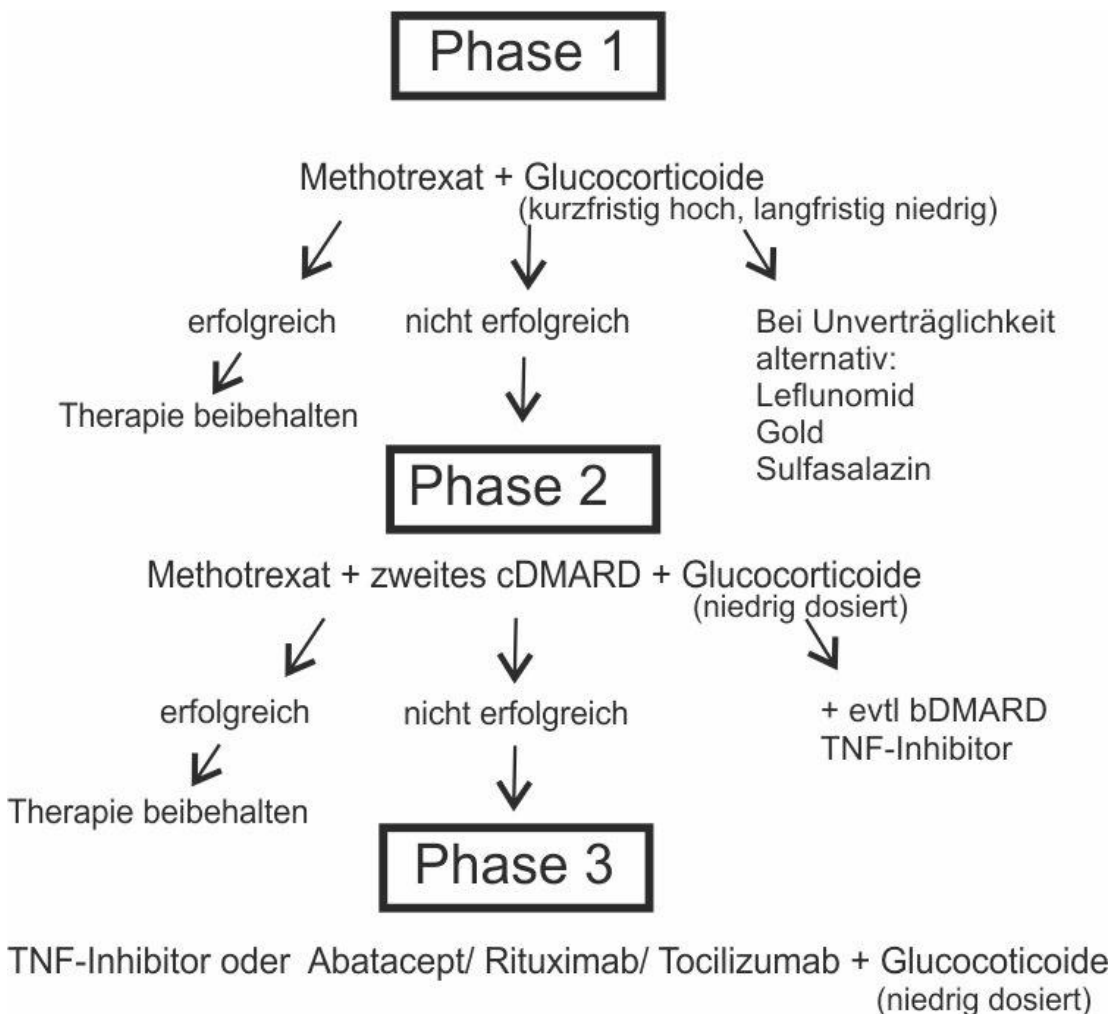


Abbildung 1: Therapieschema nach Empfehlungen der EULAR 2010

Begonnen wird in Phase 1 mit Methotrexat als Standardtherapeutikum und einer kurzfristigen Gabe von hochdosierten Glucocorticoiden im Falle eines Entzündungsschubs. Führt diese Therapie nicht zum Erfolg wird in Phase 2 ein weiteres cDMARD oder evtl. ein TNF- Inhibitor gegeben. In Phase 3 kommen dann ausschließlich die bDMARDs zum Einsatz. Dort wird dann gegebenenfalls der TNF-Inhibitor gewechselt oder ein weiteres Therapeutikum dazu genommen [Smolen JS, 2010 + update 2013].

Das Hauptaugenmerk bei einer erfolgreichen Langzeittherapie liegt also auf den DMARDs.

Bei den cDMARDs ist Methotrexat (MTX), ein Folsäureantagonist, das Mittel der ersten Wahl. In der Behandlung der RA verringert MTX die Proliferation von Lymphozyten und die Bildung von Rheumafaktoren. Es reduziert zudem die Zytokinsynthese und den Übertritt von Leukozyten aus dem Blut ins Gewebe [Pincus T, 2003].

Wenn MTX als Therapeutikum der ersten Wahl nicht vertragen wird, stehen mehrere Alternativen zur Verfügung: Leflunomid, ein Pyrimidinsyntheseantagonist; Ciclosporin, ein Immunsuppressivum; oder Sulfasalazin, ein Entzündungshemmer, der über die Prostaglandinsynthesehemmung wirkt.

Bei den bDMARDs werden zunächst TNF-Inhibitoren wie Infliximab, Adalimumab, Etanercept oder Certolizumab eingesetzt. Es gibt auch vielseitige neue *Biologicals*, die auf verschiedenen Wegen in das Geschehen eingreifen. Eine der Möglichkeiten ist Abatacept, ein humanes Fusionsprotein aus humanem CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4) und dem Fc-Teil des humanen IgG1, das die T-Zell-Kostimulation beeinflusst. Als weitere Optionen sind Rituximab, ein anti-CD20 Antikörper, Tocilizumab, ein anti-IL-6-Rezeptor Antikörper oder Anakinra, ein Interleukin-1 Rezeptorantagonist zu nennen.

Noch nicht für die RA zugelassen aber in verschiedenen Phasen der klinischen Prüfung sind Belimumab, das die B-Zell Reifung hemmt, Tofacitinib, ein JAK-Kinase Hemmer oder Fostamatinib, ein SyK-Kinase Hemmer, sowie Sekucinumab, ein anti-IL17A Antikörper. All diese neuen Therapeutika scheinen einen sehr positiven Einfluss auf den Verlauf der RA zu nehmen [Avci AB, 2015; Zampeli E, 2015; vanVollenhoven RF, 2009].

Die verschiedenen Wirkmechanismen der bDMARDs sind nochmal in Abbildung 2 zusammengefasst. Die Wirksamkeit der medikamentösen Therapie ist bei den einzelnen Patienten höchst unterschiedlich, wie sich auch der zeitliche Verlauf und die tatsächliche Auswirkung auf die Zerstörung der Gelenke stark unterscheiden. Nicht zuletzt wird daher immer wieder diskutiert, ob sich hinter dem klinischen Bild der RA verschiedene Krankheiten unterschiedlicher Pathogenese verbergen. Durch diesen Umstand gibt es leider nach wie vor Patienten, die medikamentös nicht ausreichend therapiert werden können.

Als letzte Option bleibt dann noch der operative Eingriff, bei dem gibt es entweder die Möglichkeit der Synovektomie, einer Gelenkprothese oder als Ultima Ratio die Gelenkversteifung gibt.

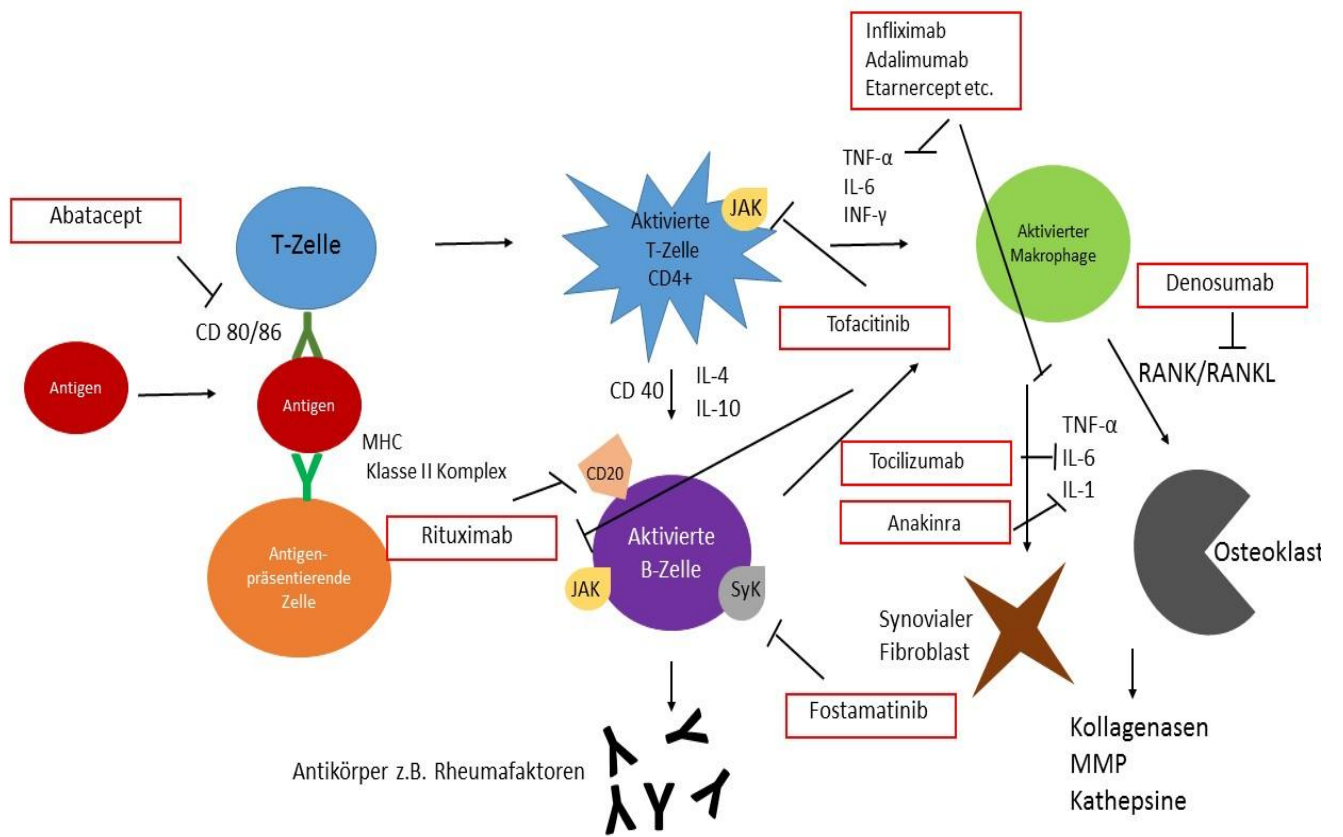


Abbildung 2: Angriffspunkte der neuen Therapieformen

In dieser Abbildung ist noch einmal das Entzündungsgeschehen in Kürze zusammengefasst um die verschiedenen Therapieansätze einer Auswahl der wichtigsten Therapeutika zu veranschaulichen. Durch den Einsatz der modernen *Biologicals* hat man die Möglichkeit, die Entzündung an verschiedensten Punkten günstig zu beeinflussen. Nichtsdestotrotz gibt es eine Gruppe von Patienten, denen auch mit diesen neuen Möglichkeiten noch nicht ausreichend geholfen werden kann. [Avci AB, 2015;Zampeli E, 2015]

Abkürzungen: JAK: Januskinase; MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex;MMP: Matrixmetalloproteinase; SyK: *Spleen tyrosine kinase*; RANKL: *Receptor Activator of NF-κB Ligand*

1.2 Das periphere Nervensystem und Entzündung

1.2.1 Das periphere Nervensystem

Das periphere Nervensystem gliedert sich in verschiedene Teile mit unterschiedlichen Funktionen. Es gibt einerseits das somatomotorische Nervensystem, auch willkürliches Nervensystem genannt, welches Bewegungen steuert, aber auch Reize, wie zum Beispiel bei Schmerzen afferent an das Gehirn zurückleitet. Dem entgegengesetzt ist das vegetative oder auch autonome Nervensystem, das sich wiederum in Sympathikus, Parasympathikus und enterisches Nervensystem unterteilt. Als enterisches Nervensystem wird das komplexe Nervengewebe des Verdauungstraktes bezeichnet, das viele Vorgänge der Verdauung autonom regelt, aber auch von Sympathikus und Parasympathikus beeinflusst wird. Das parasympathische Nervensystem vermittelt seine Wirkung sowohl prä- als auch postsynaptisch über Acetylcholin. Der Parasympathikus ist dabei für Körperfunktionen verantwortlich, die der Regeneration und dem Aufbau von Energiereserven dienen.

Das sympathische Nervensystem (SNS) verwendet präganglionär Acetylcholin und postganglionär Noradrenalin als Neurotransmitter. Allerdings sind auch Ausnahmen von dieser Regel bekannt. Die Wirkung an den Schweißdrüsen zum Beispiel wird ausschließlich über Acetylcholin vermittelt. Die Wirkung des Sympathikus hat meist eine erhöhte Leistungsbereitschaft und einen Abbau von Energiereserven zur Folge. Somit kann man Sympathikus und Parasympathikus in ihren Effekten als zwei entgegengesetzte Systeme verstehen [Mutschler E, 2007; Pongratz G, Straub RH, 2013].

Schon früh stand das periphere Nervensystem (PNS) im Verdacht, an der Entstehung und dem Schweregrad der Gelenkentzündung in der RA beteiligt zu sein [Levine JD, 1985]. Heute weiß man, dass das PNS den Entzündungsprozess aktiv mitgestaltet.

Beim sensiblen Nervensystem ist die Weiterleitung von Hitze, Kälte oder mechanischen Reizen bei Weitem nicht die einzige Aufgabe. Es kann über die entsprechenden Rezeptoren auch gezielt Entzündungsfaktoren wie Bradykinin, Prostaglandine oder bestimmte Cytokine (TNF, IL-1 oder IL-6) wahrnehmen [Basbaum AI, 2009]. Andersherum sind Neurotransmitter der sensiblen Nerven, wie Substanz P und das *Calcitonin Gene-Related Peptid 1* (CGRP-1) in der Lage, eine Entzündung durch Vasodilatation und Chemotaxis aktiv zu verstärken [Birklein F, 2008].

Der Parasympathikus wiederum hat einen entzündungshemmenden Effekt. Er kann über seinen Neurotransmitter Acetylcholin und den $\alpha 7$ nikotinischen Rezeptor, der von Makrophagen und anderen Zellen exprimiert wird, die Produktion entzündungsfördernder Zytokine wie TNF deutlich verringern [Pavlov VA, 2003].

1.2.2 Der Sympathikus in der Entzündung

In der akuten Entzündung wird die Aktivierung des Immunsystems von den sensiblen Nerven wahrgenommen. Die afferenten Nerven leiten die Information an das Gehirn weiter und dort wird die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) und damit die Cortisolsekretion sowie das SNS aktiviert. Diese Stressreaktion des Körpers dient der Energiebereitstellung durch Lipolyse, Glukoneogenese und den Abbau muskulärer Proteine. Dies dient dazu, dem aktiven Immunsystem genügend Energie bereitzustellen, da es deutlich mehr Energie verbraucht als in Ruhe [Straub RH, 2010]. Neben der Bereitstellung von Energie trägt dieses System aber auch noch auf anderem Wege zur Bekämpfung der eingedrungenen Antigene bei. Systemisch führt es zu erhöhtem Herzschlag und Lymphfluss [Howarth D, 1999]. Es fördert das Einwandern von Immunzellen über den Abbau von MMPs [Speidel WS, 2004] sowie die Modulation der Zytokinproduktion adaptiver Immunzellen in Milz oder Lymphknoten über deren β_2 -Rezeptoren [Sanders VM, 2012].

Lokal sieht der Einfluss des SNS ein wenig anders aus, dort wirkt es erst einmal vor allem antiinflammatorisch [Capellino S, 2010; Jenei-Lanzl Z, 2013]. Dies geschieht hauptsächlich über die lokale Ausschüttung von Noradrenalin, welches an β_2 -Rezeptoren bindet, die auf Immunzellen wie Makrophagen, B- und T-Zellen exprimiert werden [Nance DM, 2007], und das führt zu einer Verminderung der TNF-Sekretion bzw. Erhöhung der IL-10 Ausschüttung. Gleichzeitig kann das SNS auch über Adenosin (A_{2A}) Rezeptoren entzündungshemmend wirken [Sitkovsky MV, 2003; Blackburn MR, 2009].

Noch einmal anders ist die Situation im weiteren Verlauf der Entzündung. Hier kommt es zu einem Rückzug der sympathischen Nervenfasern aus dem entzündeten Gebiet [Miller LE, 2004; Fassold A, 2009]. Dies führt zum einen dazu, dass der antiinflammatorische Einfluss über β_2 -Rezeptoren nachlässt und gleichzeitig der proinflammatorische Effekt über α -Rezeptoren steigt. α - und β -Rezeptoren werden nicht nur von den sympathischen Nerven exprimiert sondern auch von Immunzellen. Durch den Rückzug des SNS sinkt lokal die Konzentration der Katecholamine. Die über α -Rezeptoren vermittelte, proinflammatorische Wirkung überwiegt.

Dies ist der Fall, weil die Affinität von Noradrenalin an α -Rezeptoren einhundert Mal höher ist als an β_2 -Rezeptoren [Pongratz G, 2013].

Sowohl die Menge an sympathischen Nervenfasern als auch die Anzahl der exprimierten α und/oder β -Rezeptoren ist aber keinesfalls statisch, wodurch massiv Einfluss auf das Entzündungsgeschehen genommen wird [Nance DM, 2007]. In Abbildung 3 ist dieser Zusammenhang dargestellt.

Zusätzlich ist auch das Verhältnis zwischen sensiblen und sympathischen Nervenfasern ein entscheidender Faktor. Nimmt die Anzahl der sympathischen Nerven ab verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung der entzündungsfördernden, sensiblen Nervenfasern [Miller LE, 2000].

Zusammenfassend kann man sagen, eine Entzündungsreaktion aktiviert das SNS. Der Sympathikus dient in der akuten Phase der Entzündung der Bekämpfung des Antigens, indem systemisch Energie bereitgestellt wird und lokal eine Verschiebung hin zu einem proinflammatorischen Milieu geschaffen wird.

In der chronischen Entzündung schlägt dieser positive Effekt aber ins Gegenteil um. Durch die hohe systemische Aktivität des SNS, den lokalen Rückzug der Nervenfasern und eine leicht erhöhte bis normale Aktivität der HPA-Achse, die allerdings nun ihre immunsupprimierende Wirkung verliert, wird die Entzündung befördert. Durch eine Reduktion der Glukokortikoid-Rezeptoren und dem Rückzug sympathischer Nervenfasern bei länger andauernder Stimulation, kommt es zu einer Entkopplung der Entzündung von der efferenten Steuerung durch das ZNS [Monrad EF, 2001; Straub RH, 2001].

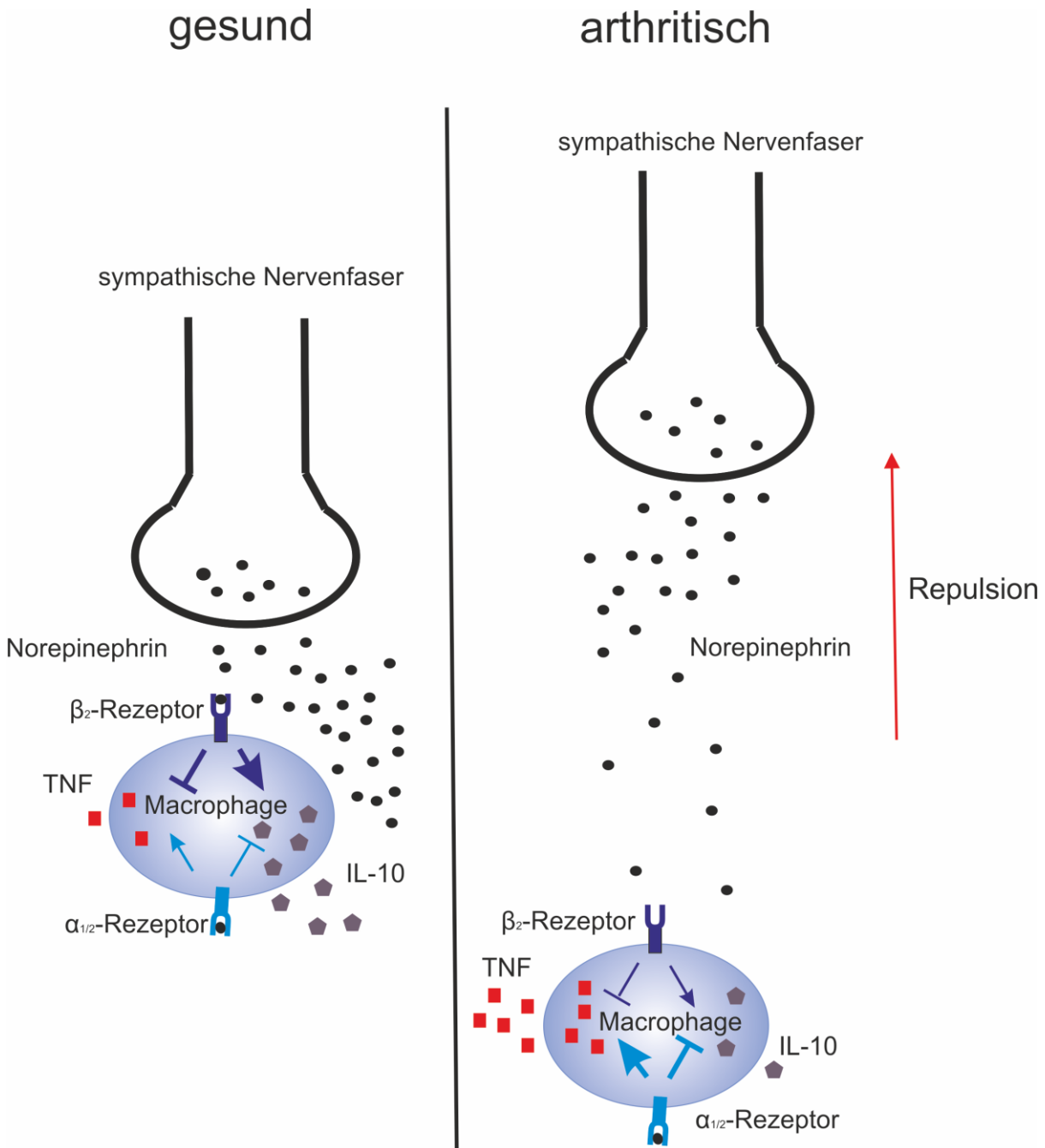


Abbildung 3: Einfluss der sympathischen Nervenfasern auf Immunzellen

Der Einfluss der Katecholamine auf die Immunzellen, hier am Beispiel eines Makrophagen, ist stark vom Abstand zu den Nervenfasern abhängig.

Links: In einem gesunden Milieu sind sympathische Nervenfasern vorhanden und durch die hohe Konzentration an Noradrenalin (NE) werden sowohl β -Rezeptoren als auch α -Rezeptoren stimuliert. In dem Fall überwiegt der entzündungshemmende Effekt über die β -Rezeptoren.

Rechts: Im Laufe der Entzündung hat sich das SNS durch den Einfluss von Semaphorinen aus dem entzündlichen Gebiet zurückgezogen. Als Folge nimmt die Noradrenalin Konzentration ab, und es findet hauptsächlich eine Anregung der α -Rezeptoren statt. Das geschieht, weil die Bindungsaffinität für Katecholamine von α -Adrenorezeptoren deutlich höher als die der β -Adrenorezeptoren ist. Bei geringerer Konzentration werden nur noch die α -Rezeptoren gebunden, und der entzündungsfördernde Effekt kommt zu Tragen [Pongratz G, Straub RH, 2014].

1.3 Axonale Wegfindung

Die Anwesenheit von Nervenfasern in einem bestimmten Gewebe ist nicht so statisch, wie man vermuten mag. Und da die An- oder Abwesenheit bestimmter Nervenfasern entscheidend für den Verlauf entzündlicher Erkrankungen wie der RA sein kann, ist ein genauer Blick auf den Mechanismus der neuronalen Vernetzung im ausgewachsenen Nervensystem von hohem Interesse.

Eine Nervenzelle teilt sich in den Zellkörper und zweierlei Fortsetzungen. Die Dendriten, die dem Zellkörper entspringen, nehmen vornehmlich Erregungen von anderen Zellen auf. Das Axon ist ein sehr langer Ausläufer, der Signale über Neurotransmitter an andere Zellen vermittelt. Am Ende des Axons ist ein Kegel mit fingerartigen Auswüchsen, der Wachstumskegel. Dieser Wachstumskegel steuert den Wachstumsprozess des Neurons [Raper J, 2010]. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, dieses Wachstum zu beeinflussen. Das Wachstum oder Abstoßung kann über direkten Kontakt mit anderen Zellen oder Geweben über membrangebundene Signalmoleküle erfolgen. Es kann auch über freie Signalmoleküle, die längere Strecken überbrücken können, eine Steuerung stattfinden. Dies wird Chemoattraktion bzw. Chemorepulsion genannt [Kolodkin AL, 2011].

Die Möglichkeiten der Lenkung sind sehr vielfältig, und so haben sich über die Zeit vier klassische Hauptfamilien der Steuerungsmoleküle herausgebildet: Die Netrine, die Slits, die Ephrine, und die Semaphorine, die größtenteils die Repulsion steuern, sowie die Neurotrophine als Wachstumsfaktoren [Dickson BJ, 2002; Bashaw GJ, 2010].

1.3.1 Netrine, Slits und Ephrine

Netrine sind kleine Proteine, die über recht weite Distanzen hinweg wirken können [Baker KA, 2006]. Wenn sie über DCC und UNC-40 Rezeptoren binden, wirken sie anziehend auf Nervenfasern. Binden sie über UNC-5 Rezeptoren ist ihre Wirkung abstoßend. Außerdem wirken sie auch noch unabhängig vom Nervensystem als Wachstumsfaktoren und in der Zelladhäsion [Lai Wing Sun K, 2011].

Slits sind Repulsionsfaktoren, die über Robo-Rezeptoren wirken, aber sie können auch die Vernetzung von Nervenzellen unterstützen [Kolodkin AL, 2011].

Ephrine sind an Zelloberflächen gebunden, sodass sie nur bei Kontakt wirken können. Sie binden an die Eph-Untergruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Die Ephrine sind für die Feinsteuerung der neuronalen Vernetzung zuständig. Sie können sogar auf bestimmte Axone abstoßend oder anziehend wirken und so einzelne Nervenfasern gezielt verbinden. Ebenso interessant ist, dass die Signalwirkung der Ephrine nicht auf die rezeptorexprimierende Zelle beschränkt ist, sondern in beide Richtungen laufen kann [Rodger J, 2012; Klein R, 2014].

1.3.2 Semaphorine

Semaphorine sind eine große Gruppe von etwa 20 Signalmolekülen, die im Menschen vorkommen. Ihnen gemeinsam ist eine Struktur von ca. 500 Aminosäuren, der sogenannten Sema-Domäne. Sie werden in insgesamt 7 Unterklassen eingeteilt, wobei nur Klassen 3 bis 7 im Menschen vorkommen. Es gibt sie sowohl in sezernierter Form (Klasse 3) als auch membrangebundener Form (Klasse 4 bis 7), was bedeutet, dass sie sowohl bei Kontakt als auch auf weitere Distanzen eine Rolle spielen [Jongbloets DC, 2014; Kolodkin AL, 2011]. Eine Übersicht über die Klassen der Semaphorine ist in Abbildung 4 dargestellt.

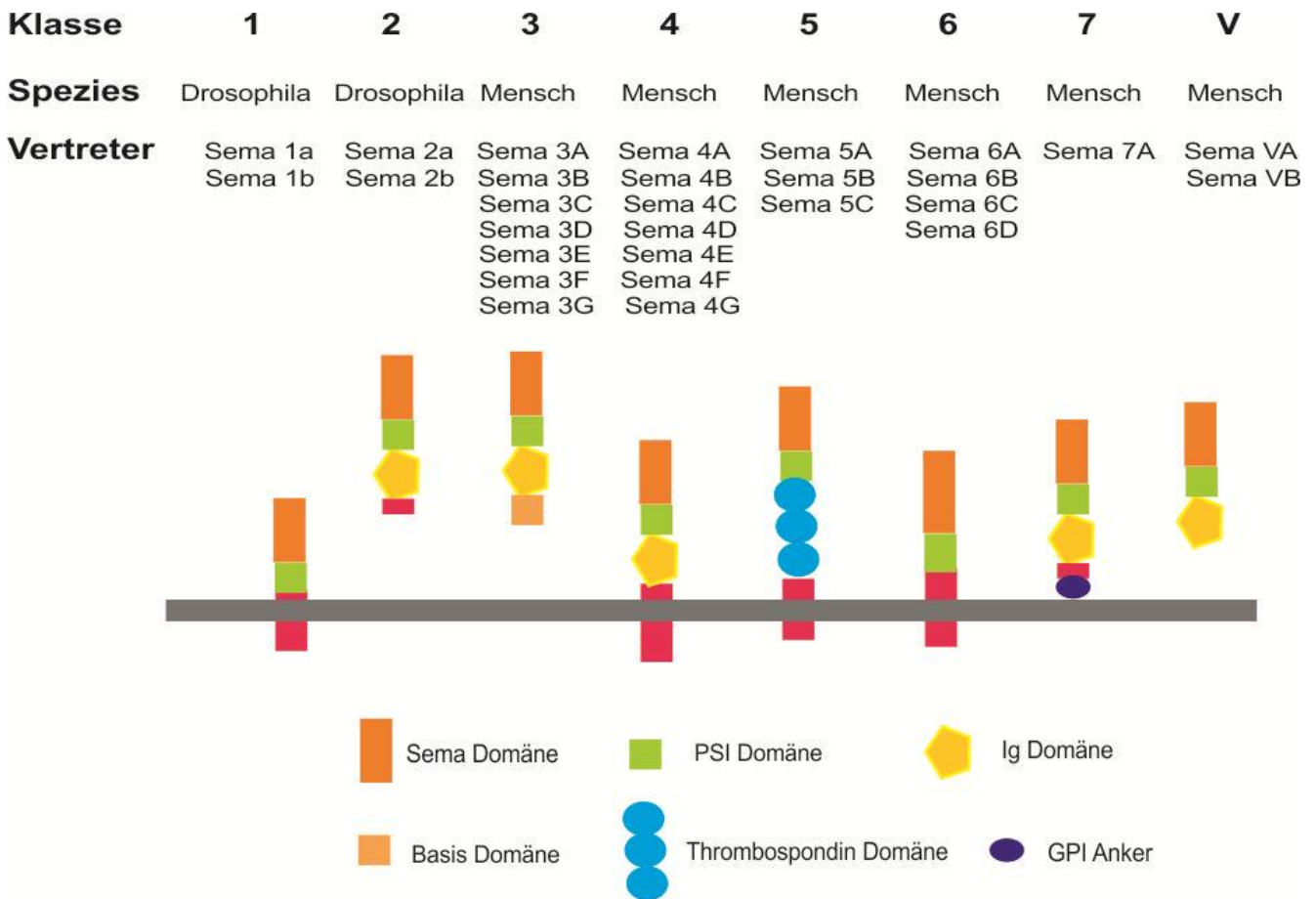


Abbildung 4: Übersicht über die verschiedenen Klassen der Semaphorine

Alle Semaphorine haben eine deutliche Strukturähnlichkeit. Klassen 1 und 2 kommen ausschließlich in Invertebraten vor. Klassen 3 bis 7 sind in Vertebraten und damit auch im Menschen aufzufinden. Bis auf die Klasse 3, die sezerniert wird, sind alle Semaphorine des Menschen membranständig. [Yazdani U, 2006]

Die meisten Semaphorine sind Repulsionsfaktoren, können aber auch anlockend wirken. Sie haben von allen Lenkungsmolekülen die höchste Diversität in ihrem Wirkspektrum. Ein klassisches Beispiel ist Semaphorin 3A, welches häufig in umgebenden Geweben der Nervenendigungen exprimiert wird, sodass der Nerv den richtigen Weg einschlägt. Auch die transmembranen Semaphorine wirken meist repulsiv [Masuda T, 2005]. Die transmembranen Semaphorine können gleichzeitig ein Signal rückkoppeln, sodass es hier eine einwärts gerichtete Signaltransduktion geben kann [Tran TS, 2007].

Die Hauptrezeptoren für Semaphorine sind Plexine. Die Familie der Plexinrezeptoren umfasst neun verschiedene Rezeptorproteine. Viele Semaphorine können direkt an Plexin binden, andere, wie die Semaphorine der Klasse 3, benötigen für eine Bindung den Corezeptor Neuropilin-1 oder Neuropilin-2, der dann zusammen mit Plexin einen Rezeptorkomplex bildet [Janssen BJ, 2012].

Die verschiedenen Semaphorine benötigen eine bestimmte Kombination aus Neuropilin-1 oder -2 mit einem bestimmten Plexin, um ihre Wirkung zu entfalten. Eine Signaltransduktion wird nur ausgelöst, wenn alle drei Komponenten, Semaphorin, Neuropilin und Plexin aneinander binden [Janssen BJ, 2012]. Dadurch kommt auch die Bifunktionalität vieler Semaphorine zustande, die je nach Rezeptorkomplex, an den sie gerade binden, sowohl repulsiv als auch anlockend wirken können [Tran TS, 2007]. Teilweise ist für die gezielte Wirkung auch noch ein IgCAM (*Immunoglobulin cell adhesion molecule*) wie L1-CAM oder N-CAM nötig [Zhou T, 2008]. Daraus wird ersichtlich, dass sich auch der intrazelluläre Signalweg deutlich unterscheiden kann und einen besonderen Einfluss auf die Signalwirkung der Semaphorine hat.

Semaphorin 3C und 3F sind für die Repulsion der sympathischen Nervenfasern bekannt und wurden auch schon in der RA nachgewiesen. Sie sind daher von besonderem Interesse [Miller LE, 2004; Fassold, 2009]. Sie binden an den Rezeptorkomplex Plexin A2/Neuropilin-2, der im Fokus dieser Arbeit stand [Gammill LS, 2006].

Allgemein wird durch die Aktivierung des Plexin-Rezeptors durch Semaphorine der Klasse 3 eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die zu einem lokalen Abbau von zytoskeletalen Komponenten des Wachstumskegels führt.

Um überhaupt an den Rezeptor binden zu können, ist eine Dimerisierung der Klasse 3 Semaphorine notwendig [Koppel AM, 1998]. Anschließend bindet dieses Dimer an ein Neuropilin, welches ebenfalls dimerisiert vorliegt [Janssen BJ, 2012]. Da Neuropiline eine sehr kurze intrazelluläre Domäne haben, dachte man lange Zeit, dass für ein Signal zwingend ein anderer Rezeptor notwendig ist. Dies muss nicht zwingend ein Plexin sein, sondern kann auch ein VEGF-Rezeptor oder Integrin sein [Guttmann-Raviv N, 2006; Fukasawa M, 2007]. Neuerdings hat sich allerdings gezeigt, dass auch Neuropilin alleine einen Einfluss auf Tumorwachstum und Apoptose haben kann [Nasarre P, 2014].

Im Falle der axonalen Wegfindung ist Neuropilin allerdings nur Corezeptor, der die Affinität von Semaphorin zum Plexin erhöht. Plexine haben eine deutlich längere intrazelluläre Domäne, die eine GAP-Domäne (GTPase aktivierendes Protein), sowie eine Rho-GTPase bindende Domäne beinhaltet. Es sind verschiedene intrazelluläre Signalwege bekannt, die in Abbildung 5 zusammen gefasst sind.

Die GAP-Domäne bindet und inaktiviert das monomere G-Protein R-Ras [Püschel AW, 2007; Uesugi K, 2009]. Dadurch wird die PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) aktiviert, die über die Aktivierung der Akt (Serin/Threonin Kinase) zu einer verminderten Zelladhäsion und einem Rückzug des Wachstumskegels führt. Dies ist der sogenannte PI3K/Akt/mTor Signalweg [Koate TM, 2015]. Interessanterweise können Semaphorine aber auch den Gegenspieler der PI3K, die Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*), aktivieren [Pasterkamp, 2009]. Dieser Mechanismus ist nochmals durch FARP2, einen *Rac1 exchange factor* (RacGEF), am intrazellulären Teil des Plexin rückgekoppelt. Dieser Signalweg ist in Abbildung 5 grün dargestellt.

Ein anderer Weg wurde bisher für die Aktivierung des Plexin A1 durch Semaphorin 3A beschrieben [Toyofuku T, 2005]. Hier dissoziiert FARP2 vom Rezeptor und aktiviert Rac1. Rac1 kann entweder über RND-1 (*Rho family of GTPases*) R-Ras inaktivieren oder über PAK (*p21-activated Kinase*) und LIM- Kinase 1 den Cofilin-Weg aktivieren, und so ebenfalls einer Zerstörung der Aktinstruktur und damit einen Zusammenbruch des Wachstumskegels induzieren [Aizawa H, 2001; Nasarre P, 2014]. In Abbildung 5 ist dieser Weg gelb dargestellt.

Ein weiterer Mechanismus, der zu einem Zusammenbruch der Aktinfilamente führt, ist die Plexin-bedingte Aktivierung von Mical (*Molecule Interacting with CasL*, eine Flavin-Adenin-Dinukleotid abhängige Monooxygenase). Zum einen kann Mical Methionin zu Methioninsulfoxid oxidieren. Da Methionin für die Polymerisation von Aktin nötig ist, wird diese behindert und das Aktin wird destabilisiert. Diese Oxidation kann durch die Methioninsulfoxid-Reduktase (Sel-R) rückgängig gemacht werden. Zum anderen setzt Mical Wasserstoffperoxid frei, das CRMP2 (*Collapsin response mediator protein*) oxidiert und dimerisiert und zu einer Interaktion mit Thioredoxin und damit zum Kollaps der Mikrotubuli führt [Terman JR, 2002; Hung RJ, 2011; Hota PK, 2012]. Dies ist der blaue Pfad in Abbildung 5.

Die beschriebenen Wege sind nur die Signalwege, die einen Einfluss auf die neuronale Steuerung haben, und auch hier ist noch nicht ganz klar, welcher der wichtigste ist. Es sind noch einige andere intrazelluläre Signalwege bekannt, die auf andere Corezeptoren wie Integrine oder IgCAMs zurückgehen.

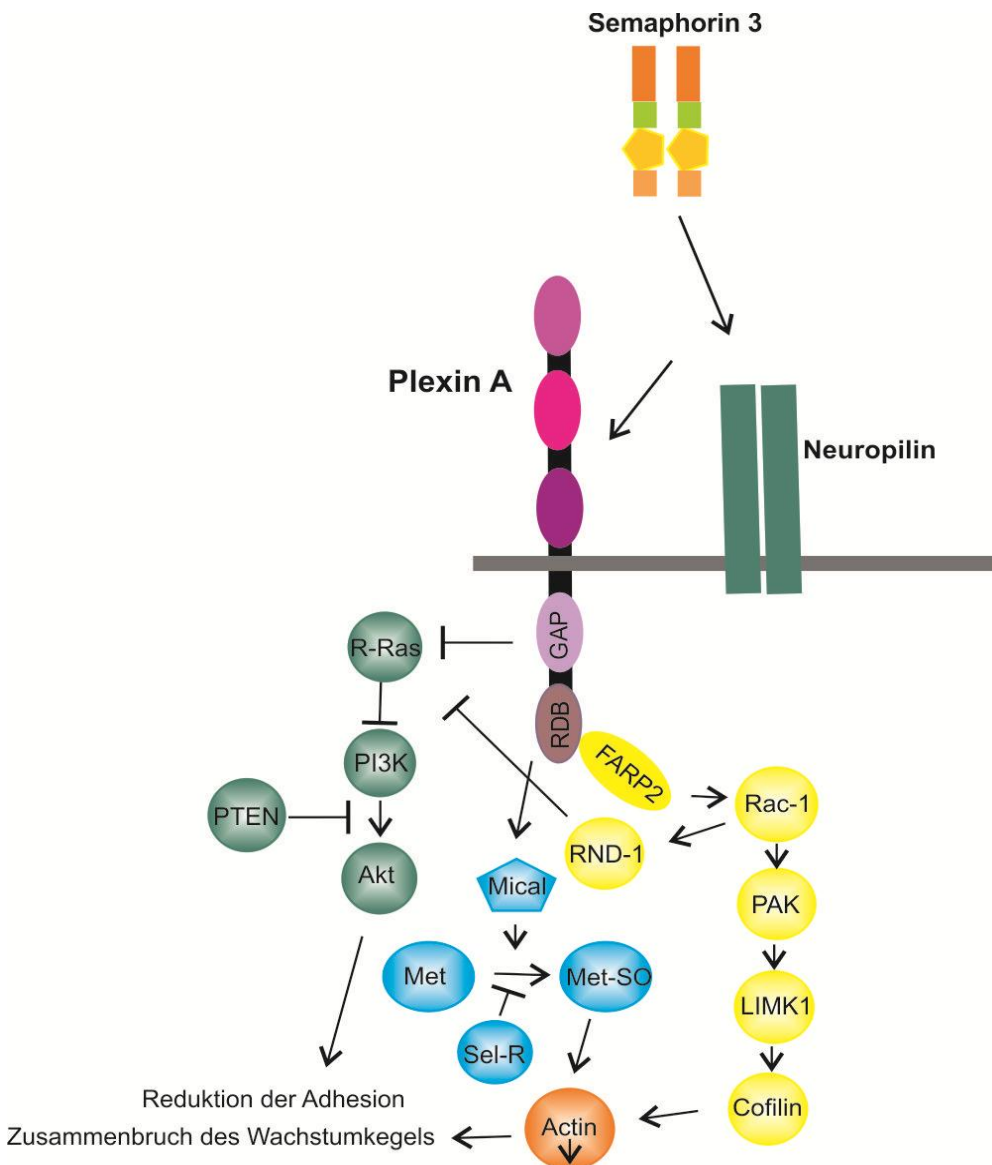


Abbildung 5: Zusammenfassung der Signalwege zur neuronalen Repulsion am Plexin A/ Neuropilin Korezeptor ausgelöst durch Semaphorine der Klasse 3

Hier sind die drei Hauptwege aufgeführt, die zu einer Verringerung der Adhäsion und einem Zusammenbruch des neuronalen Wachstumkegels, ausgelöst durch Semaphorine der Klasse 3, führen.

Grün: Die GAP-Domäne des Plexins inaktiviert R-Ras, das wiederum die PI3K hemmt und so Akt aktiviert, die den Rückzug einleitet. PTEN kann der Aktivierung von Akt entgegenwirken.

Gelb: Vom Plexin A dissoziiertes FARP2, das Rac-1 aktiviert, kann entweder über RND-1 ebenfalls R-Ras hemmen oder über PAK/LIMK/Cofilin die Struktur der Aktinfilamente verändern und so zum Kollaps des Wachstumkegels führen.

Blau: Auch Mical kann durch Oxidation des Methionins die Quervernetzung behindern und so die Struktur verändern. Durch Sel-R wird Methionin wieder reduziert. (Nasarre P, 2014; Hota PK 2012; Pasterkamp, 2009)

Abkürzungen: Akt: Serin/Threonin Kinase; FARP2: Rac1 exchange Faktor; GAP: GTPase aktivierendes Protein; Mical: Molecule Interacting with CasL; PAK: p21-aktivated Kinase; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; PTEN: Phosphatase and Tensin homolog; R-Ras: G- Protein, *Rat sarcoma*; RND-1:Rho family of GTPases; Sel-R: Methioninsulfoxid-Reduktase

1.3.3 Morphogene und Neurotrophine

Neben den oben beschriebenen Hauptgruppen der Lenkungsmoleküle gibt es auch noch andere Moleküle, die das Wachstum von Nervenfasern beeinflussen können. Zu den sogenannten Morphogenen gehören Wnt, SHH (*sonic hedgehog*) und TGF β (*transforming growth factor β*)/BMP (*bone morphogenic protein*). Sie spielen allerdings eher im ZNS und in der embryonalen Entwicklung eine lenkende Rolle [Sanchez-Camacho C, 2009; Yam PT 2013].

Neurotrophine sind Wachstumsfaktoren für Nervenzellen. Sie sichern das Überleben der Zellen und steuern die Differenzierung [Jakobsen MD, 1996]. Zu dieser Gruppe gehören NGF (*nerve growth factor*), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NT-3 (Neurotrophin-3) und NT-4/5 (Neurotrophin-4/5). Sie alle vermitteln ihre Effekte über Tyrosinkinase-Rezeptoren (Trk) [Huang EJ, 2001; Miller FD, 2001]. Der Hauptsignalweg ist hierbei eine Aktivierung des R-Ras/PI3K/Akt Signalweges [Chao MV, 2003].

1.4 Zielsetzung

Der beobachtete Rückzug sympathischer Nervenfasern aus dem Entzündungsgebiet der rheumatoiden Arthritis trägt zu einer Verschlimmerung und vielleicht sogar der Chronifizierung des Entzündungsgeschehens bei. Ein Verbleib der Nervenfasern dicht am Entzündungsherd könnte durch die höhere Katecholamin-Konzentration und das Gleichgewicht zwischen sensiblen und sympathischen Nerven eine Verbesserung der Entzündung zur Folge haben. Das wäre eine neue Möglichkeit der Therapie der RA.

In der RA sind die Repulsionsfaktoren Semaphorin 3F und 3C, die selektiv auf den Sympathikus wirken, lokal erhöht [Fassold A, 2009; Koeck, 2009]. Der Rückzug des SNS aus dem entzündeten Gebiet wird über den Plexin A2/ Neuropilin-2 Rezeptorkomplex mit Semaphorin 3C oder 3F als Liganden ausgelöst [Yazdani U, 2006].

An diesem System gilt es also Eingriffsmöglichkeiten zu finden, die eine Repulsion verhindern können. Dies eröffnet mehrere Angriffspunkte: Erstens könnte eine Blockade des Plexin A2 Rezeptors günstig sein, sodass der intrazelluläre Signalweg nicht mehr zur Verfügung steht. Zweitens könnte eine Blockade des Neuropilin-2 Korezeptors relevant sein, um eine effektive Bindung von Semaphorin zu behindern. Drittens könnte das Neutralisieren des freien Semaphorins erfolgversprechend sein.

Ziel ist es:

1. Es sollten Substanzen gefunden werden, die den Rückzug der sympathischen Nervenfasern *in vitro* hemmen. Als Methode dient hier der Neuriten-Repulsionsassay.
2. Die Effektivität dieser Substanzen sollte dann auch *in vivo* am Mausmodell der experimentellen Arthritis gezeigt werden.
3. Es sollte die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Nervenfasern *in vivo* dargestellt werden. Hierfür sollte eine transgene Maus hergestellt werden, bei der der Neuropilin-2 Rezeptor fluoreszent mit eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) markiert ist.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Es folgt eine tabellarische Aufstellung der für diese Arbeit notwendigen Geräte, Chemikalien und Verbrauchsartikel sowie Antikörper, Proteine und Peptide.

2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage Sartorius analytic A120S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Durchlichtmikroskop	E. Leitz, Wetzlar, Deutschland
ELISA Reader	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop inkl. Axiovision Software	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Homogenisator IKA ® Ultra- Turrax	Medita, Hof, Deutschland
pH-Meter	Wiss. Tech. Werkst., Weilheim, Deutschland
Pipetten 10; 100; 200; 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Stemi biokulares Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Thermocycler TRISTAR	Biometra, Göttingen, Deutschland
Waage Sartorius excellence E1200S	Sartorius, Göttingen, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Accutase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BDNF	R+D systems, Minneapolis, USA
B27 Zusatz für neuronale Zellkulturen	Gibco/ Life technologies, USA
bFGF	R+D systems, Minneapolis, USA
Bovines Kollagen Typ II	MD Bioscience, Zürich, Schweiz
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ciprofloxacin	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Collagenase Typ I	Gibco/ Life technologies, USA
Cytosin- Arabinofuranosid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dispase II / neutral protease grade II	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
DNA release	Thermo Fisher, Waltham, USA
Erylysepuffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Freund Adjuvant, komplett	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
FGF8	R+D systems, Minneapolis, USA
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Insulin (human)	Lilly, Gießen, Deutschland

Krebs-Ringer-Substrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumselenit	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nerve growth factor	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Non-protein blocking buffer	Thermo Fisher, Waltham, USA
PBS (Phosphate buffered saline)	PAA laboratories, Pasching, Österreich
Phosphat-Citrat Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin / Streptomycin	Thermo Fisher, Waltham, USA
Progesteron	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protein free blocking buffer	Thermo Fisher, Waltham, USA
Putrescin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sonic hedgehog	R+D systems, Minneapolis, USA
Streptavidin/HRP	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TMB Tabs	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Transferrin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triiodothyronin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Thyroxin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tryptanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ultra TMB (fertige Lösung)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
8 well chamber slides mit Poly-D-Lysin	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Hamiltonspritze 1 ml	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
NUNC maxisorp 96-well Platten	Thermo Fisher, Waltham, USA
Peptid coating ELISA Kit	TaKaRa Bio Inc., Japan
Petrischalen, 35 mm	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zellsieb, 40 µm	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Zellkulturflaschen T25/T50/T75/T100	Corning, USA

2.1.4 Antikörper, Proteine und Peptide

Antikörper/ Protein/ Peptid	Hersteller	Anwendung
Goat anti-Plexin A2 Antikörper, Polyklonal anti-human/mouse/rat	R+D systems, Minneapolis, USA Bestellnummer: AF5486	Repulsionsassay, Phage display, ELISA, CIA
Goat anti-Neuropilin-2 Antikörper, Polyklonal anti- mouse/rat	R+D systems, Minneapolis, USA Bestellnummer: AF567	Repulsionsassay, CIA
Mouse anti-Neuropilin-2 Antikörper, Monoklonal anti- human	R+D systems, Minneapolis, USA Bestellnummer: MAB2215	Immunfluoreszenz
Plexin A2 rekombinantes Protein human	Abnova/ Biozol, Eching, Deutschland Bestellnummer: H00005362-P01	Phage display

Recombinant Semaphorin 3F Fc-chimera	R+D systems, Minneapolis, USA Bestellnummer: 3237-S3	Repulsionsassay
VEGF 165 from mouse	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Bestellnummer: SRP4364	Repulsionsassay
Neuropilin-2 Fc chimera rekombinantes Protein, human	R+D systems, Minneapolis, USA Bestellnummer: 2215-N2	Phage display, Immunfluoreszenz
Rabbit anti goat, biotinyliert	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	ELISA
Alexa fluor 546 goat anti mouse	Life technologies, USA	Immunfluoreszenz
Alexa fluor 546 rabbit anti goat	Life technologies, USA	Immunfluoreszenz
AV1 Ac-WLFQRDPGDR- NH2	Prof. Dr. Ines Neundorf, Lehrstuhl für Chemie, Universität Köln	Repulsionsassay, ELISA
AV2 Ac-QATVKWLFQRDPGDRR- NH2	Prof. Dr. Ines Neundorf, Lehrstuhl für Chemie, Universität Köln	Repulsionsassay, ELISA
AcB13 Ac-DSSDQFSFDYEQN-NH2	Prof. Dr. Ines Neundorf, Lehrstuhl für Chemie, Universität Köln/ Bachem Holding, Bubendorf, Schweiz	Repulsionsassay, ELISA
AcB14 Ac-DSSIQFFSFEKDKERI- NH2	Prof. Dr. Ines Neundorf, Lehrstuhl für Chemie, Universität Köln/ Bachem Holding, Bubendorf, Schweiz	Repulsionsassay, ELISA
AcB15 Ac-DSSLQFEYIDDPR- NH2	Prof. Dr. Ines Neundorf, Lehrstuhl für Chemie, Universität Köln/ Bachem Holding, Bubendorf, Schweiz	Repulsionsassay, ELISA

AcB16	Prof. Dr. Ines Neundorf, Lehrstuhl für Chemie, Universität Köln/ Bachem Holding, Bubendorf, Schweiz	Repulsionsassay, ELISA
Ac-DSSLQFEYIDDPVQR- NH ₂		
Biotinyl-AcB13	Bachem Holding, Bubendorf, Schweiz	ELISA
Biotinyl-εAhx- DSSDQFSFDYELEQN- NH ₂		
Biotinyl-AcB14	Bachem Holding, Bubendorf, Schweiz	ELISA
Biotinyl-εAhx- DSSIQFFSFEKDKERI- NH ₂		

2.1.5 Medien und Puffer

Ham´s F12/ Glutamax Medium (Gibco/ Life technologies, USA)

62,5 I.E. humanes Insulin

0,9% Ciprofloxacin

1% Pen/Strep

„F12 Zusatz“ siehe Tabelle unten

Medium für sympathische Mausganglien

Dulbecco´s modified Eagle´s Medium/ Ham´s F12 (DMEM/F12, Gibco/ Life technologies, USA)

10% FCS

1% Pen/strep

Medium für mesenchymale Stammzellen

Neurobasal medium (Gibco/ Life technologies, USA)

B27 Zusatz von Gibco

„neurogene Zusätze“ siehe Tabelle

*Medium für dopaminerge Differenzierung*50 x TAE Puffer

2 M Tris, 1 M Essigsäure, 100 mM EDTA

pH 8,3

DEPC- PBS

5 PBS Tabletten und 1 ml DEPC in 1 Liter Wasser

2.2 Patienten

Die Gewebeproben für die Gewinnung humaner Stammzellen wurden im Rahmen einer Gelenkersatzoperation gewonnen. Die Patienten wurden über die Studie vor der Operation aufgeklärt und haben dies auch schriftlich bestätigt. Die Ethikkommission der Universität Regensburg hat diese Studie genehmigt (Antragsnummer: 13-101-0135). In allen Fällen wurde das Knie operiert. Die Patienten mit rheumatoider Arthritis waren alle weiblich und durchschnittlich 66 Jahre alt. Die Patienten mit Osteoarthritis waren sowohl männlich (40%) als auch weiblich (60%) und durchschnittlich 63 Jahre alt.

2.3 Mäuse

Die Mäuse für die folgenden Untersuchungen wurden in den zentralen Tierlaboratorien der Universität Regensburg in SPF-Haltung untergebracht. Sie wurden bei konstanten Temperaturverhältnissen von 21° C in einem 12-stündigen Tages- und Nachtrhythmus bei unbegrenztem Zugang zu Nahrung und Wasser gehalten. Die Versuchstiere wurden zur Eingewöhnung mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn in den Versuchsraum gebracht und zu je fünf Tieren pro Käfig oder bei Zuchtpaaren in einer 1:2 Anpaarung gehalten. Alle Tierexperimente wurden entsprechend den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und gemäß den Richtlinien für tierexperimentelle Forschung der Regierung der Oberpfalz genehmigt (AZ 54-2532.1-43/12). Zur Untersuchung der Repulsion von sympathischen Ganglien wurde der Mausstamm C57Bl6/J und für die experimentelle Arthritis DBA/1 verwendet.

2.4 Gewinnung sympathischer Ganglien für *in vitro* Repulsionsversuche

2.4.1 Ausbau sympathischer Ganglien

Die Methode zur Gewinnung von sympathischen Nervenfasern aus Grenzstrangganglien junger Mäuse wurde 2010 erstmals veröffentlicht [Fassold A, 2010].

Hierzu wurden 2-5 Tage alte Mauswelpen des Mausstammes C57Bl6/J getötet und die paravertebralen Grenzstrangganglien unter dem Stereo-Aufsicht-Mikroskop mit einer Pinzette entfernt. Die ausgebauten Ganglien wurden in einem Zellsieb in Ham's F12/ Glutamax Medium gesammelt. Dem Medium wurden noch die in der untenstehenden Tabelle gelisteten Zusätze zugegeben.

Substanz	Menge/ml Ham's F-12 Glutamax Medium
BSA	3,5 mg
Cytosin-Arabinofuranosid	2,4 µg
Insulin	0,125 I.E.
NGF	100 ng
Progesteron	60 ng
Putrescin	8,8 µg
Transferrin	34 µg
Triiodothyronin	340 ng
L-Thyroxin	400 ng
Natriumselenit	38 ng
Ciprofloxacin	16 µg
Penicillin/Streptomycin	100 U

Anschließend wurden die Ganglien bei 37°C etwa 30 Minuten mit Dispase II verdaut und dreimal in frischem Medium für 5 Minuten gewaschen. Danach wurden die Ganglien einzeln in mit Poly-D-Lysin beschichteten *chamber slides* gesetzt und wuchsen zwei Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ aus. Nach zwei Tagen sind bei etwa einem Viertel der Ganglien Nervenfasern gewachsen.

2.4.2 Repulsionsassay

Bei einem nach zwei Tagen gut ausgewachsenen Ganglion wird das Wachstumsmedium durch Krebs-Ringer-Lösung ersetzt, die mit HEPES auf einen pH-Wert von 7,4 gepuffert wurde. Wurde eine Block-Substanz verwendet, so wurde diese 30 Minuten vor Zugabe von Semaphorin 3F zum

Ganglion zugegeben. Unter einem *live cell imaging* Mikroskop wurden die Nervenfasern über fünf Stunden beobachtet. Während dieser Zeit wurde die Temperatur in einem Inkubator konstant bei 37°C gehalten. Für die Auswertung wurden 20 bis 25 gut erkennbare Nervenfasern im Gesichtsfeld ausgesucht und mit einem gelben Kreuz markiert. Die Fasern, die sich über den Beobachtungszeitraum von 5 Stunden zurückgezogen haben wurden rot markiert und die ausgewachsenen Nervenfasern grün. So ergibt sich eine prozentuale Angabe der ausgewachsenen und zurückgezogenen Nervenfasern in Bezug zur Gesamtmenge der beobachteten Nervenfasern.

Die humanen, induzierten Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen (Herstellungsprotokoll siehe 2.8) wurden in ihrem Differenzierungsmedium belassen und ebenfalls bei 37°C im Inkubator unter dem Mikroskop beobachtet. Bei diesen Zellen wurde eine Anzahl von ca. 25-30 Nervenzellen markiert und ein Verkürzen bzw. eine weitere Vernetzung über den Zeitraum von 5 Stunden beobachtet und in Bezug zur Gesamtzahl gesetzt. In Abbildung 6 wurde jeweils von den Ganglien (Abbildung 6a) und den Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen (Abbildung 6b) das erste und letzte Foto einer solchen Filmreihe gegenübergestellt.

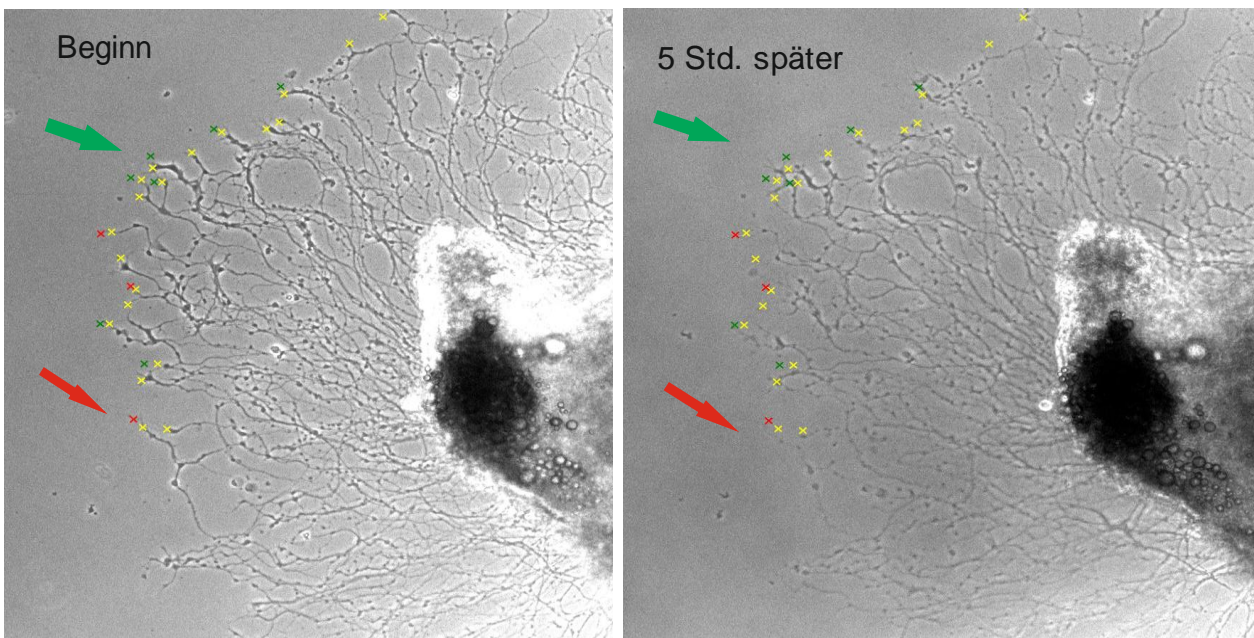


Abbildung 6a: Der Repulsionsassay

Sympathische Mausganglien im Repulsionsassay. Die in die Beobachtung mit einbezogenen Nervenfasern wurden mit einem gelben Kreuz markiert. Die zurückgezogenen Fasern wurden zusätzlich rot markiert und die gewachsenen Fasern grün. In diesem Vergleich ist jeweils eine zurückgezogene und eine ausgewachsene Nervenfasern, die besonders gut zu erkennen ist, mit einem Pfeil der jeweiligen Farbe markiert.

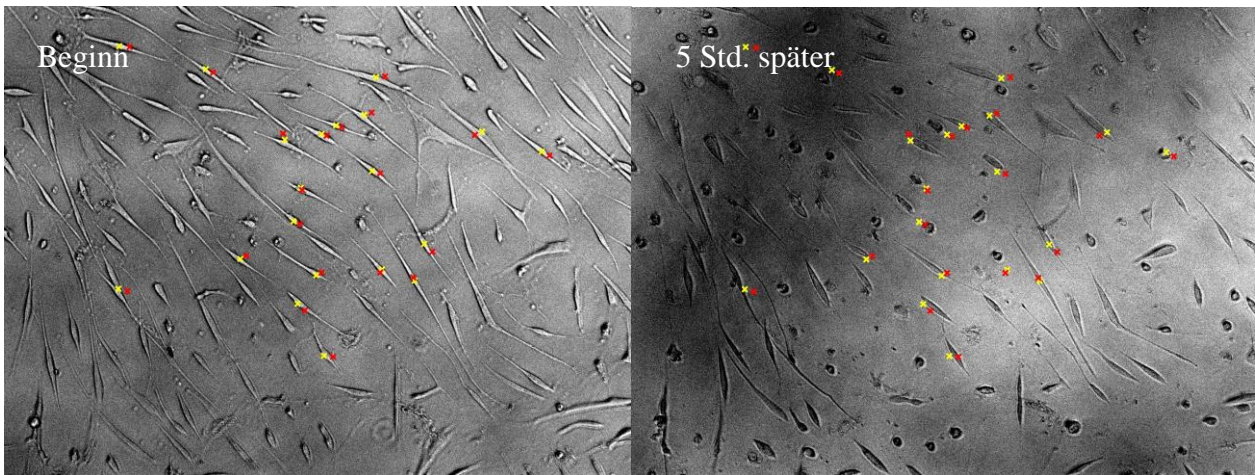


Abbildung 6b: Der Repulsionsassay

Humane TH positive Zellen. Die Auswertung erfolgte analog zu der in Abbildung 6a beschriebenen.

2.5 Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis

Für dieses Arthritis Modell wurden 8-10 Wochen alte, männliche DBA1/J Mäuse verwendet. Zur Induktion der Arthritis wurde bovines Kollagen Typ II und komplettes Freund Adjuvant zu gleichen Teilen unter Kühlung im Ultraschallhomogenisator gemischt. 100µl dieser Emulsion wurde den Mäusen intracutan im Bereich Schwanzwurzel injiziert. Nach etwa zwanzig Tagen entwickeln diese Mäuse erste klinische Anzeichen der Arthritis. Ab diesem Zeitpunkt wurde bei den Tieren täglich der Schweregrad der Arthritis mittels eines Scoresystems bestimmt. Es wurden an jedem Bein vier der Zehen, der Mittelfuß und das Sprunggelenk getrennt voneinander beurteilt. Je nach Stärke der Entzündungszeichen wurden pro Gelenk 0 Punkte für keinerlei Anzeichen bis 2 Punkte für starke Schwellung und Entzündung vergeben. Kam es im Laufe des Entzündungsgeschehens zu Läsionen an Mittelfuß oder Sprunggelenk wurden hierfür 0,5 Punkte extra vergeben. Wenn man 8 Punkte für die Zehen und je 2,5 Punkte an Mittelfuß und Sprunggelenk annimmt, so kommt man zu einem maximalen Score von 52 Punkten. Zum Ende des Versuches kommt es zu einem Ausklingen der Entzündung und einer chronischen Versteifung der betroffenen Gelenke mit deutlicher Bewegungseinschränkung. Die steifen Gelenke haben ebenfalls den vorherigen Entzündungsscore beibehalten, da dies nur den weiteren Verlauf der Erkrankung und keine Besserung darstellt. In Abbildung 7 wird der Verlauf der Erkrankung anhand von Beispielbildern dokumentiert.



Abbildung 7: Mäusepfoten in den verschiedenen Stadien der Kollagen-induzierten Arthritis

Links: Eine gesunde Pfote ohne Anzeichen von Entzündung. Diese Pfote bekommt noch keine Scorepunkte.

Mitte: Eine maximal betroffene Pfote hier sind alle Zehen, (je 2 Punkte) der Mittelfuß mit Hautläsionen (2,5 Punkte) und das Sprunggelenk mit Läsionen betroffen. Das ergibt für diesen Fuß einen Score von 13 Punkten.

Rechts: Ein Fuß nach abgeklungener Entzündung. Hier wird der gegebene Entzündungsscore beibehalten. Es ist deutlich zu sehen, dass die Gelenke versteift sind. Die Maus zeigt kein reflektorisches Spreizverhalten wie bei der gesunden Pfote

2.6 Phage display

2.6.1 Phage display Übersicht

Phage display ist eine Methode zur Aufklärung von Protein Interaktionen und wird häufig zur Entwicklung neuer biologischer Arzneistoffe und therapeutischer Antikörper herangezogen. Es ist eine Selektionstechnik, die darauf basiert, dass Proteine, Peptide oder Antikörper an der Oberfläche von Bakteriophagen exprimiert werden. Dafür wird die cDNA für randomisierte Peptide in das verkürzte Gen für das Hüllprotein eines Phagen eingebracht. In diesen rekombinanten Phagen hat man nun ein randomisiertes, exprimiertes Peptid an der Oberfläche und gleichzeitig die dazugehörige DNA im Inneren. Durch das Klonieren der DNA-Sequenzen in den Phagenvektor erhält man so bis zu 10^{10} verschiedene Peptide mit codierender DNA in sogenannten Phagenbibliotheken. Anhand dieser Bibliotheken kann man nun eine Selektion aufgrund der Affinität zu einem bestimmten Protein durchführen.

Diese Selektion findet in mehreren Stufen statt und wird *Panning* genannt. Die Phagenbibliothek

wird mit dem Zielprotein inkubiert und passende Peptide können erstmals binden. Die nicht gebundenen Phagen werden zunächst in mehreren Waschschritten entfernt. Die gebundenen Phagen werden darauf im nächsten Schritt vom Protein abgelöst. Dies ist besonders einfach, da die Phagen in einem sehr breiten pH-Bereich stabil sind und sogar Acetonitril überleben.

Mit diesen Phagen werden darauf hin *E. coli* Bakterien infiziert, um die Phagen zu vervielfältigen.

Die vervielfältigten Phagen werden anschließend wieder mit dem Protein zusammengebracht und die gebundenen Klone abgelöst. Dieser Schritt wird mehrfach wiederholt. Dabei kann jedes Mal der Selektionsdruck erhöht werden, sodass am Schluss nur noch hochaffine Bindungspartner übrig bleiben. Nach dem *Panning* wird die dem rekombinanten Oberflächenprotein entsprechende DNA-Sequenz extrahiert, per PCR vervielfältigt und per DNA-Sequenzierung sequenziert. Über den genetischen Code ist dann auch die Aminosäuresequenz des bindenden Proteins bekannt. Die schematische Durchführung ist in Abbildung 8 dargestellt.

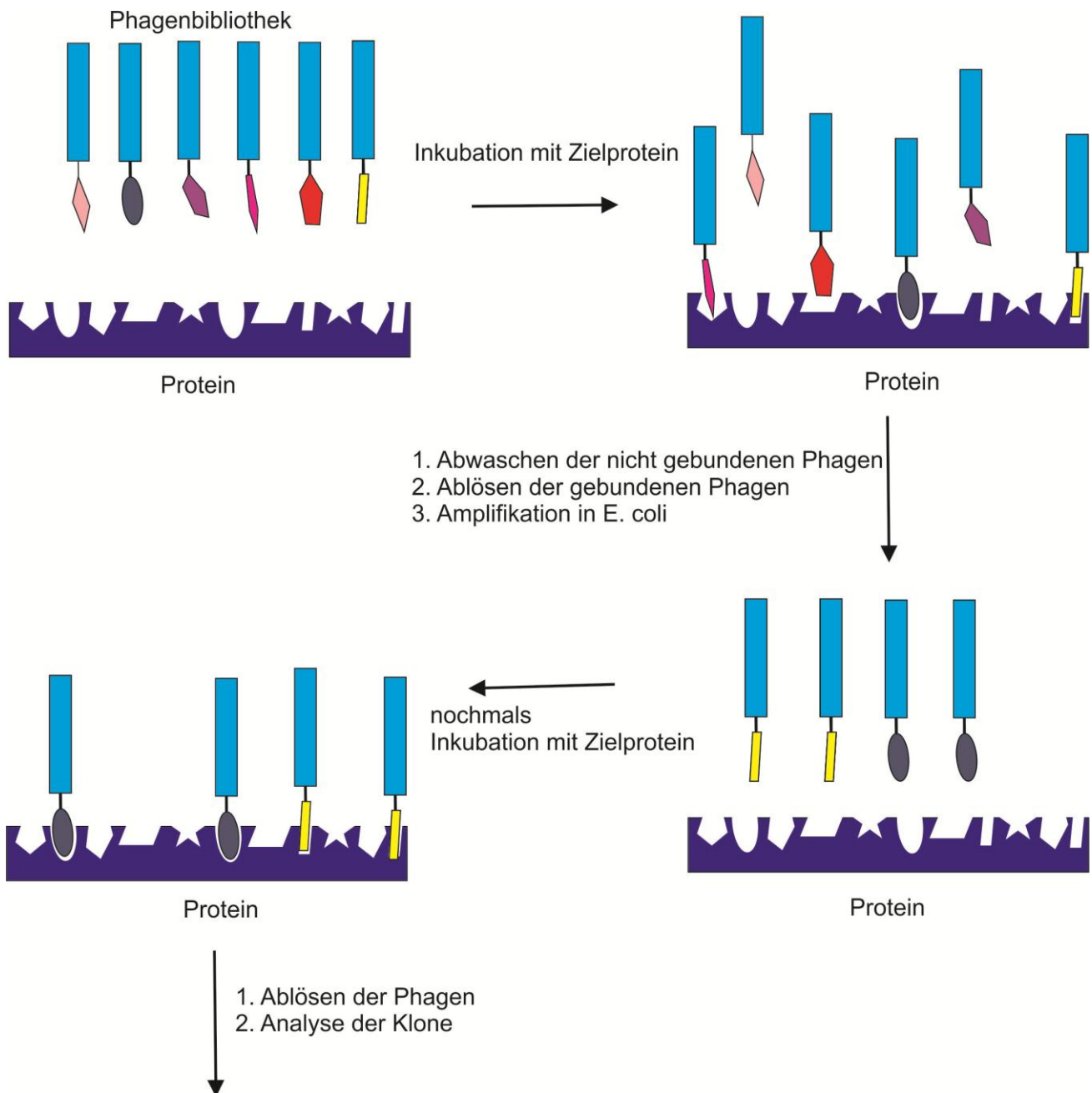


Abbildung 8: Schema zur Durchführung des Phage display

Dies ist eine vereinfachte Darstellung der Ligandenselektion von einer Phagenbibliothek (*Panning*). Während verschiedener Waschschritte wird der Selektionsdruck soweit erhöht, dass man aus der naiven Bibliothek eine mit potentiellen Bindungspartnern angereicherte Bibliothek erhält, aus der man die besten Kandidaten selektiert.

2.6.2 Blockende Peptide aus Phage display

Das Phage display wurde als Auftragsarbeit am Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie unter Leitung von Dr. Michael Szardenings durchgeführt und wird daher im Folgenden nur kurz beschrieben.

Für die Herstellung der blockenden Peptide wurden drei Proteine ausgewählt. Ein polyklonaler anti-Plexin A2 Antikörper (R+D, AF 5486), das humane Plexin A2 Protein isoliert aus Weizenkeimen (Abnova, H00005362-P01) und das humane Neuropilin-2/Fc aus Myelomazellen der Maus (R+D, 2215-N2).

Für das Phage display wurde eine randomisierte Phagenbibliothek des Fraunhofer Institutes in Leipzig verwendet. Da der Anti-Plexin A2 Antikörper die besten Ergebnisse erzielte, wurde bei diesem eine zweite, noch nicht ganz fertig etablierte Bibliothek eingesetzt, die ein wenig längere Peptidsequenzen und mehr unterschiedliche Klone enthält.

Die Durchführung unterscheidet sich ein wenig für die einzelnen Proteine.

Das Plexin A2 Protein

Das Plexin A2 Protein wurde in 50 mM Tris-HCl gelöst, danach wurde 10 mM reduzierendes Glutathion zugegeben und auf pH-Wert 8.0 eingestellt. Das entsprach einer Konzentration von 0.22 µg/µL. Anschließend wurde das Protein auf Immuntubes fixiert und mit 1% BSA geblockt.

Die Eluierung der gebundenen Phagen von der Oberfläche erfolgte mit 0.1 M Glycin HCl bei pH-Wert 2.2. Mit Tris.HCl wurde die Lösung neutralisiert und auf einen pH-Wert von 8.0 eingestellt.

Das Neuropilin-2 Protein

Das Neuropilin-2 Protein wurde zu einer Konzentration von 100 µg/mL in PBS resuspendiert. Anschließend wurde es durch chemische Kopplung an Carboxy-Dynabeads gekoppelt und mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid / N-Hydroxysuccinimid aktiviert. Geblockt wurde mit 1% BSA. Die Inaktivierung der Beads erfolgte mit 0.1 M Ethanolamin bei einem pH von 8,5.

Der Anti-Plexin A2 Antikörper

Der Anti-Plexin A2 Antikörper wurde in PBS resuspendiert. Das entspricht einer Konzentration von 0.2 mg/mL. Die Kopplung an Carboxy-Dynabeads geschah chemisch mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid / N-Hydroxysuccinimid. Es wurde mit einer 1%igen BSA Lösung geblockt. Inaktiviert wurde mit 0.1 M Ethanolamin bei pH 8,5.

Nach dem *Panning* wurden die interessanten Klone nochmal per Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) auf ihr Bindungsverhalten überprüft.

Für den ELISA wurde das Zielmolekül zu 100ng pro well in 96-well high binding ELISA Platten ge-coated. Anschließend wurde mit 1% Ovalalbumin geblockt und die Phagen aus dem Überstand 1:1 mit 1% Ovalbumin verdünnt, aufgereinigt und zu 10^{10} cfu/well zugegeben. Das dreimalige Waschen erfolgte mit 0.1% Tween/PBS. Zur Detektion der Phagen wurde ein Anti-M13-HRP gekoppelter Antikörper in 1:1000 Verdünnung zugegeben.

2.7 Nachweis und Bestimmung der Bindungseigenschaften der Peptide

Nachdem im Phage display erfolgreich Peptidsequenzen gefunden wurden, wurde eine Auswahl dieser Sequenzen synthetisiert. Um die Peptide nun nachweisen zu können und ihre tatsächliche Bindungsfähigkeit an das Zielmolekül bestimmen zu können, wurden verschiedene ELISAs entwickelt.

2.7.1 ELISA mit Anti-Plexin A2/ Semaphorin 3 F/ Neuropilin-2 *Coating*

Bei diesen ELISAs, die im Aufbau gleich sind, ging es beim Anti-Plexin A2 *Coating* um eine Möglichkeit die Peptide AcBl₃ und AcBL₄ zu detektieren. Da sie auf dem Anti-Plexin A2 Antikörper selektiert wurden, kann man von einer guten Bindungskapazität ausgehen. Bei den anderen beiden *Coatings* mit Semaphorin 3F und Neuropilin-2 ging es darum, herauszufinden an welchen Bindungspartner die Peptide im Rezeptorkomplex binden.

Für diese ELISAs wurde das jeweilige Protein zu 2µg/ml in PBS gelöst und in 96-well multisorp

Platten für zwei Stunden bei Raumtemperatur ge-coated.

Anschließend wurde eine Stunde mit *Protein-free Blocking Puffer* geblockt und die Peptide in entsprechender Konzentration über Nacht bei 4°C zugegeben. Nachgewiesen wurden die Peptide mit dem Anti-Plexin A2 Antikörper (R+D, AF5486), der zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Im nächsten Schritt wurde dieser Antikörper mit einem biotinylierten *rabbit anti-goat* Antikörper und Steptavidin-HRP/ Tetramethylbenzidin (TMB) detektiert. Das Waschen zwischen den einzelnen Schritten erfolgte dreimal mit 0,05% Tween 20 in PBS. Dieser ELISA ist für das Peptid und seine biotinylierte Variante in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

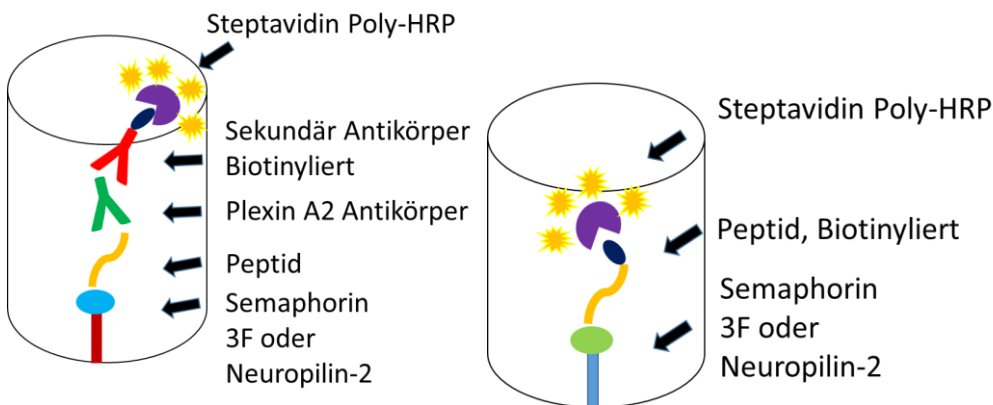


Abbildung 9: Schema des Semaphorin 3F/ Neuropilin-2 ELISA

Links: Das Schema für die Peptide die mit einem Anti-Plexin A2 Antikörper und einem Sekundärantikörper detektiert werden.

Rechts: Die biotinylierten Peptide können ohne den Einsatz weiterer Antikörper direkt mit Streptavidin-HRP detektiert werden.

2.7.2 ELISA mit Peptid Coating

Zusätzlich ging es darum, die Peptide für einen *in vivo* Einsatz im Mausserum detektieren zu können. Dazu wurde ein ELISA mit den beiden im Repulsionsassay erfolgreichen Peptiden AcBl₃ und AcBl₄ gemacht.

Hierzu wurde ein spezieller Peptidbindungs-Kit (TaKaRa) verwendet. Das Peptid wurde in dem Reaktionspuffer des Kits in entsprechender Konzentration gelöst und in die mitgelieferten 96-well Platte pipettiert. Danach wurden noch 10 ml des *Coupling Agent* hinzugegeben und für zwei

Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Blocking Puffer, ebenfalls im Kit enthalten, geblockt.

Daraufhin wurden die Peptide mit 0,5 µg/ml polyklonalen Anti-Plexin A2 Antikörper (R+D, AF 5486), der im Blocking Puffer gelöst wurde, über Nacht bei 4°C nachgewiesen. Detektiert wurde die Bindung mit einem biotinylierten *rabbit anti-goat* Antikörper, der eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben wurde. Daraufhin folgte eine Inkubation mit Streptavidin/HRP für eine Stunde. Danach erfolgte die Farbentwicklung mit Tetramethylbenzidin (TMB), das in Phosphat-Citrat Puffer gelöst wurde. Der Stopp erfolgte mit 1M Schwefelsäure. Zwischen den einzelnen Schritten wurde, um ungebundene Komponenten zu entfernen, jeweils dreimal mit Aqua bidest. gewaschen. Die Durchführung dieses ELISAs ist in Abbildung 10 dargestellt.

Bei den Versuchen mit Mausserum wurde Blut entweder aus der Schwanzvene oder, nach Töten des Tieres, direkt aus der linken Herzkammer entnommen. Das Blut wurde in Eppendorfcups ohne Gerinnungshemmer überführt und mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis das Blut geronnen war. Anschließend wurde das Serum vom Blutkuchen durch Zentrifugieren für 10 Minuten bei 13000 rpm abgetrennt, in frische Eppendorfcups überführt und für den ELISA verwendet.

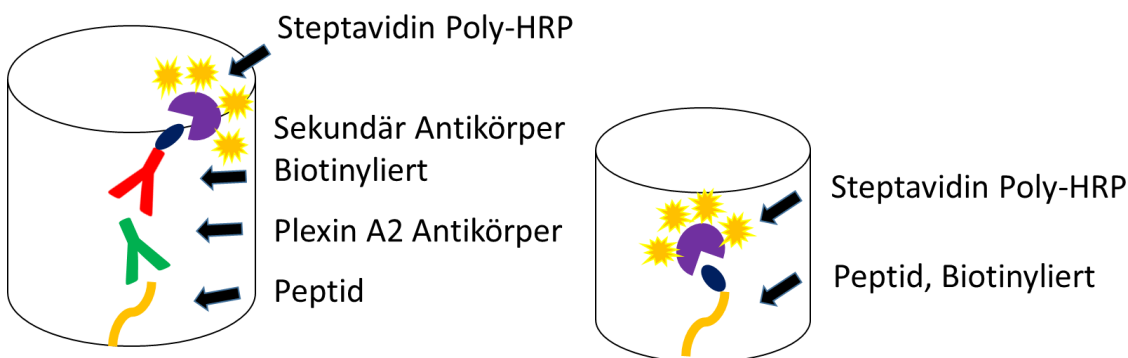


Abbildung 10: Schema für den ELISA auf Peptidbindungsplatten zum Nachweis aus dem Mausserum

Links: Das Schema für die Peptide, die mit dem Anti-Plexin A2 Antikörper und einem Sekundärantikörper detektiert wurden.

Rechts: Die biotinylierten Peptide können ohne den Einsatz eines Antikörpers direkt mit Streptavidin-HRP sichtbar gemacht werden.

2.8 Herstellung humaner, induzierter Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen

2.8.1 Gewinnung von Stammzellen aus Fettgewebe

Die Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe (ASC) erfolgte aus Fettgewebe, das im Zuge einer Operation wegen künstlichem Gelenksersatz in der Nähe des betroffenen Gelenkes entnommen wurde. Dieses Fettgewebe wurde zerkleinert und mit 50-100 U/ml Kollagenase Typ I in PBS mit 1% BSA eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde zur Inaktivierung der Collagenase mit PBS verdünnt, und die größeren Gewebsreste durch ein 70µm Sieb entfernt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 1500U/min abzentrifugiert und anschließend 5 Minuten in Erylysepuffer gegeben. Nach Beendigung der Erylyse durch Zugabe von PBS wurde nochmals bei 1500U/min 5 Minuten zentrifugiert, und anschließend das Zellpellet in Dulbecco´s modified Eagle´s Medium/ Ham´s F12 (DMEM/F12) aufgenommen und in Zellkulturflaschen ausgesät [Jenei-Lanzl Z, 2015; Estes BT, 2010].

2.8.2 Differenzierung zu induzierten Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen

Zwischen Passage 3-10 konnten die kultivierten ASCs für die Differenzierung verwendet werden. Dazu wurden sie mit Accutase von der Zellkulturflasche gelöst und nach dem Auszählen zu je 7000 Zellen pro well in Poly-D-Lysin 8-well chamber sildes ausgesät. Zum Adhärieren wurden sie über Nacht in DMEM/F12 bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen das Neurobasal-Medium (Zusätze siehe Tabelle) getauscht.

Substanz	Menge/ml Neurobasal Medium
B27	2 ml
SHH	250 ng
FGF8	100 ng
bFGF	50 ng
BDNF (Tag 9)	50 ng

Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen unter hypoxischen Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂ und 1% O₂ weiter kultiviert. Ohne weiteren Medienwechsel wurden am neunten Tag 50 ng/ml BDNF zugefügt. Nach 3 weiteren Tage waren die Zellen ausdifferenziert und wurden für die weiteren Experimente verwendet. Die Charakterisierung dieser Zellen erfolgte bereits in anderen Arbeiten [Jenei-Lanzl Z, 2015; Trzaska KA, 2011]. Abbildung 11 zeigt beispielhaft die Morphologie der ausdifferenzierten Zellen.

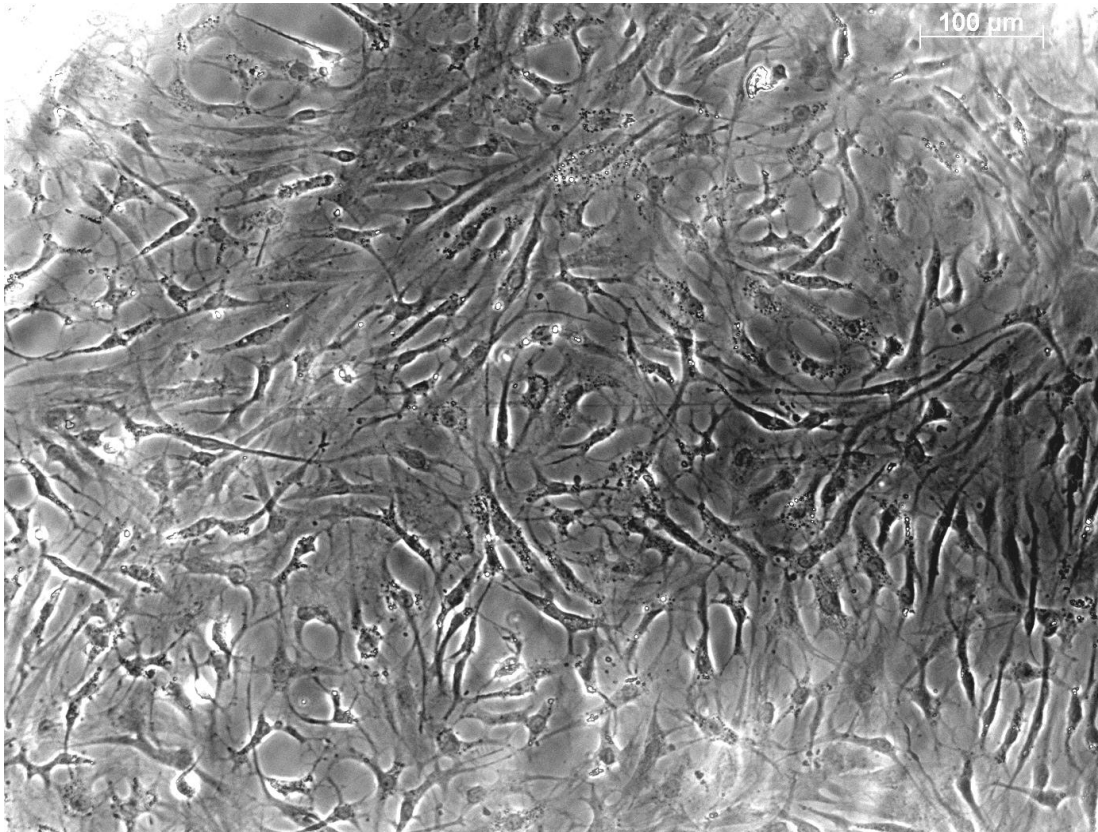


Abbildung 11: Morphologie der ausdifferenzierten Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen

Das Bild wurde am Tag 12 der Differenzierung aufgenommen. Es ist sehr gut zu sehen, dass die Zellen auch in ihrer Morphologie Nervenzellen ähneln. Sie haben die charakteristische längliche Form und bilden mit ihren Ausläufern Verbindungen.

2.9 Nachweis von Plexin A2 und Neuropilin-2 auf induzierten Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen

Zum Nachweis von Neuropilin-2 und Plexin A2 wurden die humanen induzierten Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen immunfluoreszent gefärbt.

Hierfür wurden die Zellen in dem 8-well chamber slide nach der Differenzierung mit 3,7% Formalin in DEPEC-Wasser für fünf Minuten fixiert. Danach wurde mit 10% BSA und 10% Kaninchen-Serum oder Ziegen-Serum je nach sekundärem Antikörper in TBS mit 0,3% Triton 45 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Der primäre Antikörper (Anti-Plexin A2 Antikörper R+D, AF5684 oder Anti-Neuropilin-2 Antikörper R+D, MAB 2215) wurde in einer Konzentration von 10µg/ml bei 4°C über Nacht aufgetragen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor 546 *rabbit anti-goat* für den Plexin A2 Antikörper und Alexa Fluor 546 *goat anti-mouse* für den Neuropilin-2 Antikörper zwei Stunden bei Raumtemperatur gefärbt. Nach dem Waschen mit PBS (3x) wurden Aufnahmen unter dem Fluoreszenzmikroskop gemacht (Abbildung 12).

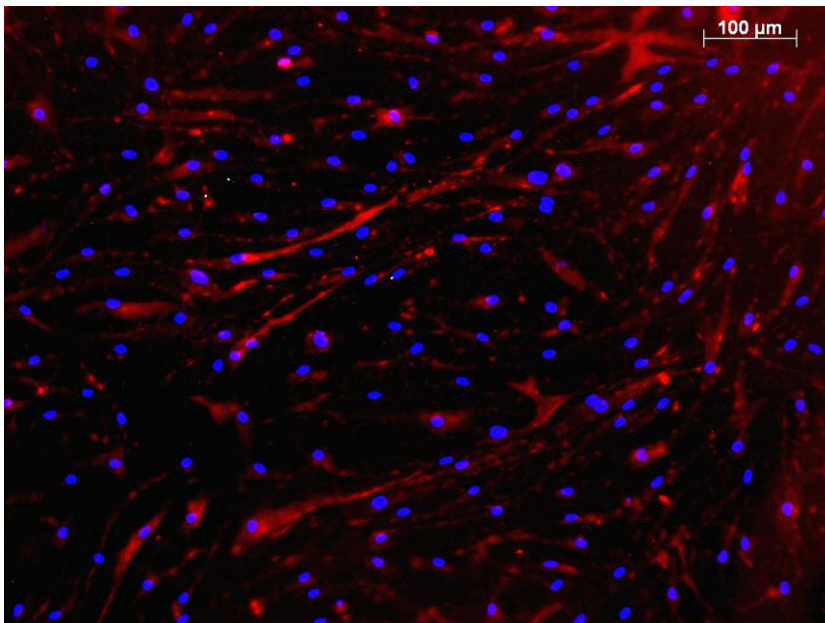


Abbildung 12: Beispielfärbung der ausdifferenzierten Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen aus RA mit dem Anti-Plexin A2 Antikörper

2.10 Herstellung einer transgenen Neuropilin-2/eGFP Maus

2.10.1 Allgemeines Prinzip und Zuchtziel

Die Herstellung einer transgenen Neuropilin-2/eGFP Maus wurde bei der Firma Ozgene, Murdoch, Australien in Auftrag gegeben.

Um eine transgene Maus herzustellen, muss man in das Genom der Maus artfremde DNA einbringen. In diesem Fall wurde das Gen für eGFP eingebracht. [Chalfie M, 1994]. Das Vehikel mit dem dieses Gen in den fremden Organismus geschleust wird, ist der Vektor. In diesem Fall hat Ozgene einen sogenannten Plasmidvektor hergestellt. Also einen Vektor der aus Bakterien, in diesem Fall E.coli gewonnen wird. Damit eine Bakterie so ein, auch für sie artfremdes Gen herstellt, braucht es in dem Vektor einen prokaryontischen Promoter.

Hat man nun diesen Vektor produziert, muss er in eine embryonale Stammzelle eingebracht werden. Um die Stammzellen auszusortieren, die diesen Vektor enthalten, beinhaltet der Vektor eine Neomycin-Resistenz-Kassette. Damit sind die erfolgreich transfizierten Zellen gegen Neomycin bzw. Geneticin, ein nicht nur für Prokaryoten sondern auch für eukaryotische Zellen toxisches Aminoglycosid-Antibiotikum, resistent. So können alle Zellen, welche die Resistenz nicht enthalten abgetötet werden, und die erhaltenen Zellen können von einer Maus ausgetragen werden [Regenass-Klotz, 1998].

Sind nun diese chimären Jungtiere entstanden, sind prokaryontischer Promoter und Neo-Resistenz überflüssig und müssen entfernt werden. Dies geschieht durch das sogenannte Flp/ FRT System. Dazu wird vor und nach den zu entfernenden Sequenzen ein *Flippase recognition target* (FRT) eingebracht, das von einer Rekombinase, der Flippase (Flp), erkannt und herausgeschnitten werden kann. Hierzu müssen die chimären Tiere mit Mäusen, die das Gen für Flippase tragen, gekreuzt werden. Um das Gen für Flp wieder zu entfernen, damit es in weiteren Zuchtschritten nicht stört, muss noch eine Rückkreuzung mit Wildtyp-Mäusen (C57B6 Hintergrund) stattfinden.

Mit einem ähnlichen System ist das eGFP in dem Vektor nochmal gesichert. Es muss gesondert aktiviert werden, um auch exprimiert zu werden. Dies macht das System während der Kreuzungsschritte weniger anfällig für Fehler. Man hat so auch die Möglichkeit das Gen nicht nur ubiquitär sondern gewebespezifisch zu aktivieren. Das hier verwendete Modell ist das sogenannte CRE/loxP System. Hier kann die Erkennungsstelle loxP mit einem CRE (causes recombination) Enzym geschnitten werden. Der Vektor enthält das „normale“ Gen, das abgelesen wird, und hinter

dem eine Stoppssequenz liegt, die verhindert, dass das mit eGFP markierte Gen abgelesen wird. Wird nun dieses Gen inklusive der Stoppssequenz mittels CRE/loxP entfernt, ist das veränderte Gen aktiv. Dies erfolgt wieder durch Kreuzung mit Mäusen, die das CRE Gen tragen. Hier gibt es verschiedene Stämme die entweder CRE überall oder nur in bestimmten Geweben exprimieren.

Die genetisch veränderte Maus wurde nach Entfernen der Neo-Resistenz und des prokaryontischen Promotors nach Regensburg geliefert. Es war daher zuerst eine Rückkreuzung mit C57B6 Wildtyp-Mäusen nötig. Um anschließend erfolgreich mit einer passenden CRE Maus verpaaren zu können, ist es empfehlenswert, eine homozygote Maus zu haben. Somit war hier nochmals ein züchterischer Zwischenschritt nötig. In Abbildung 13 sind der eingebaute Vektor und die züchterischen Zwischenschritte graphisch dargestellt.

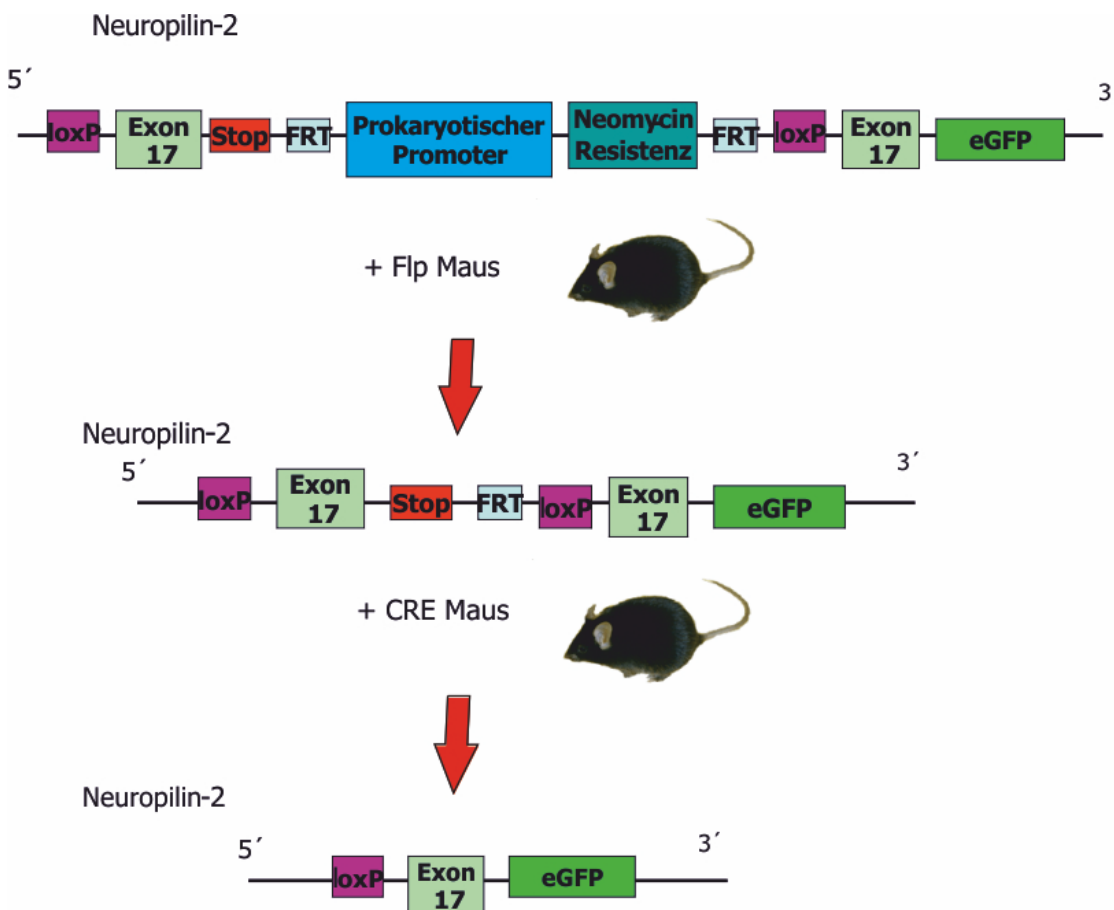


Abbildung 13: Darstellung des Vektors in der transgenen Neuropilin-2/eGFP Maus

Oben: Der vollständige Vektor, der in die embryonale Stammzelle eingebracht wurde.

Mitte: Vektor nach Kreuzen mit einer Flp-Maus. Neomycin-Resistenz--Kassette und prokaryontischer Promotor sind entfernt. Eine Rückkreuzung mit dem Wildtyp zur Entfernung des Flp ist noch notwendig. So wurde die transgene Maus an uns ausgeliefert.

Unten: Endgültig aktivierte eGFP Sequenz gekoppelt an das Gen für Neuropilin-2 das auf Exon 17 Chromosom 1 sitzt. Abkürzungen: FRT: Flippase recognition target eGFP: enhanced green fluorescent protein Neo: Neomycin

2.10.2 Genotypisierung der Mäuse mittels PCR

Als ersten Zuchtschritt nach Erhalt der Mäuse von der Firma Ozgene galt es, durch Verpaarung mit C57B6 Wildtyp-Mäuse die Flippase zu entfernen und, da es sich um heterozygote Mäuse handelte, das eGFP zu erhalten. Dafür wurde bei den Jungtieren, die im Alter von etwa drei Wochen abgesetzt wurden, eine Schwanzbiopsie durchgeführt, um Genmaterial zu gewinnen. Hierzu wurden 2-4 mm der Schwanzspitze mit einem Skalpell abgetrennt und auf Eis gelagert. Die Schwanzstücke wurden mit 19,5 µl TE Puffer (pH 8,0) und 0,5 µl DNA Release 15 Sekunden gevortext und anschließend 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Probe einmal bei 75°C 5 Minuten erwärmt und danach bei 96°C zwei Minuten in einem Wärmeblock erhitzt. Anschließend wurde 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, und die im Überstand enthaltene DNA abgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Die Primer wurden mit Hilfe des Programms Vektor NTI von Invitrogen entwickelt. Hergestellt wurden die Primer von der Firma Eurofins Scientific, Luxemburg.

Primer	Sequenz	Produkt
Flp-forward	CGTCAGTTTGTGGAAAGGTTTG	349 Basenpaare
Flp-reverse	CTTCTTCCGATGATTCGAACTG	
eGFP-forward	ACAAGCAGAAGAACGGCATC	485 Basenpaare
eGFP-reverse	ACGATCCCCTTCACAGCTG	

Durchgeführt wurde die PCR mit folgendem Reaktionsansatz:

Reagenz	Menge	Reagenz	Menge
Zweifach Puffer für Hot start Phusion	10 µl	eGFP-reverse	1 µl
Flp-forward	1 µl	Wasser	1,6 µl
Flp-reverse	1 µl	Polymerase Hot start Phusion	0,4 µl
eGFP-forward	1 µl	DNA	4 µl

Initiale Denaturierung bei 98°C für 2 min

Denaturierung bei 98°C für 10 Sekunden

Kühlung bei 55°C für 20 Sekunden

Verlängerung der Ketten bei 72°C für 23 Sekunden

Finale Verlängerung der Ketten bei 72°C für 7 Minuten

Insgesamt dauert das Programm im Thermocycler eine Stunde und 45 Minuten.

Die so vervielfältigte DNA wurde anschließend auf ein 1,3% iges Agarose Gel aufgetragen und in einem TRIS-Acetat-EDTA-Puffer per Elektrophorese (100 Volt, 600 mA, eine Stunde) aufgetrennt.

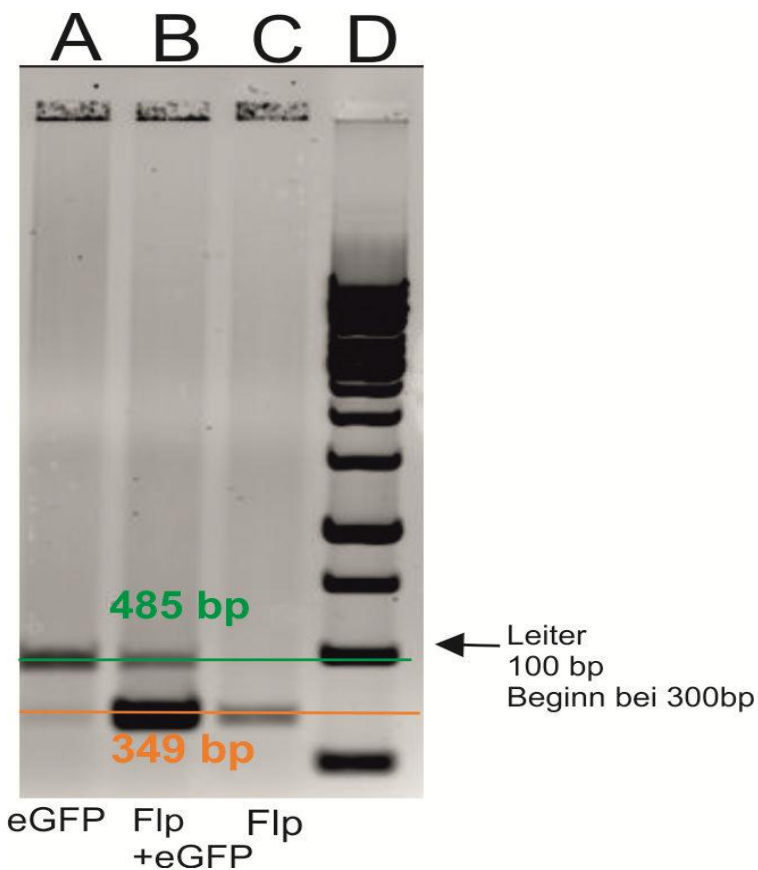


Abbildung 14: PCR auf Anwesenheit von Flp und eGFP

Dies ist ein Beispiel für den ersten Zuchtschritt. A: Dies ist eine Maus mit positiver Bande für eGFP und ohne Flp. Mit diesen Mäusen (A) wurde weiter gezüchtet. B: Das ist eine Maus, bei der eGFP aber auch Flp anwesend sind. C: Hier gibt es nur eine Flp-Bande. eGFP wurde nicht weiter vererbt. Die letzten beiden (B+C) Mäuse wurden nicht weiter verwendet. D: Dies ist die 100 Basenpaar-Leiter, die Leiter beginnt auf dem Bild erst bei 300bp. Abkürzung: bp: Basenpaar

Um das Stoppkodon innerhalb der loxP Sequenzen zu schneiden (siehe Abbildung 13) wurden zwei verschiedene ubiquitäre CRE-exprimierende Mausstämme verwendet. Als erstes wurde B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J (Jackson laboratory, Stock No: 006054) eingesetzt, bei der das CRE-Gen mit einem Cytomegalie-Virus eingebracht wurde und in allen Geweben inklusive Keimzellen exprimiert wird. Als zweites wurde eine B6.FVB-Tg(EIIa-cre)C5379Lmgd/J (Jackson laboratory, Stock No: 003724) verpaart. Auch diese Maus exprimiert CRE in allen Geweben inklusive der Keimzellen, hat allerdings häufig eine mosaikartige Expression. Das Cre-Gen wurde mit dem EIIa-Adenovirus-Promotor eingebracht. Beide Mausstämme wurden schon erfolgreich eingesetzt [Lakso M, 1996; Schwenk F, 1995]. Zur Überprüfung der beiden Stämme wurde eine B6.129X1-Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP)Cos/J (Jackson laboratory, Stock No: 006148) kurz ROSA-YFP Reportermaus eingesetzt. Diese hat ähnlich unserer Maus ein mit loxP Sequenzen umschlossenes Stoppkodon und exprimiert, wenn dies geschnitten wurde, in allen Geweben eYFP.

Als nächsten Schritt galt es nun zum einen homozygote von heterozygoten Mäusen zu unterscheiden und gleichzeitig festzustellen, ob nach einer Verpaarung mit CRE Mäusen der geflochte Teil auch geschnitten wurde. Dazu wurde ein Wildtypprimer entwickelt, der sich über die Region des Exon 17 zieht, in die der Vektor eingebaut ist. Ist die Maus nicht transgen, ist der von dem Primer erfasste Bereich 261 Basenpaare groß. Befindet sich das eGFP dazwischen, ist die Sequenz um etwa 700 Basenpaare länger (961 Basenpaare). Wenn der Bereich noch nicht geschnitten ist, ist die Sequenz so lang, dass sie in der PCR nicht mehr vervielfältigt wird.

Für die zweite PCR wurden folgende Primer eingesetzt:

Primer	Sequenz	Produkt
Wildtyp-forward	CTCCTTTACTGCACCTGCTC	261 Basenpaare
Wildtyp-reverse	GCCTGTCTGTCCTGTCCATA	Wenn transgen 700 Basenpaare länger

Die PCR erfolgte genauso wie zuvor beschrieben.

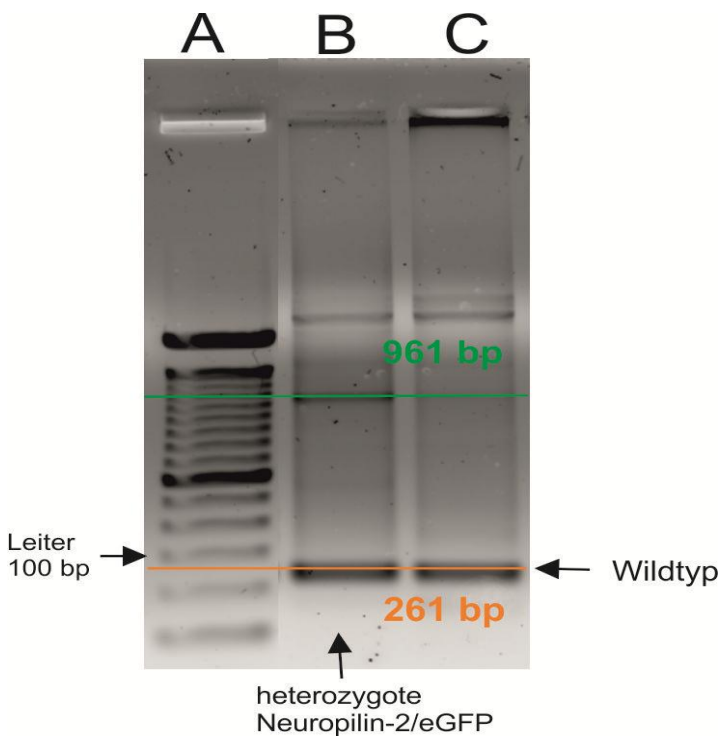


Abbildung 15: PCR auf Wildtyp

Hier ist ein Beispiel für den zweiten Zuchtschritt. Die PCR dient der Differenzierung zwischen Mäusen mit geschnittener loxP Sequenz, noch ungeschnittener loxP-Sequenz oder Wildtyp-Mäusen. . A: Hier befindet sich die 100bp Leiter. B: Dies ist eine heterozygote Maus mit geschnittener Sequenz, da sie beiden Banden hat. C: Hier befindet sich der Wildtyp mit der Wildtypbande und ohne geschnittener loxP.

Abkürzung: bp: Basenpaar

2.11 Statistik

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Box-Plots mit Median und mit 25. und 75. Perzentile, sowie als Median mit 75% Perzentile bei den Tierexperimenten. Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für die statistische Analyse wurde das Programm SigmaPlot (V.11.0, Systat Software, Inc., Erkrath, Deutschland) verwendet. Unterschiede ab $p < 0.05$ wurden als signifikant erachtet.

Bei eingezeichneten Regressionsgeraden wurden die dazugehörige Geradengleichung und der quadrierte Korrelationskoeffizient R^2 angegeben. Beides wurde in Excel (Windows Excel 2013) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorarbeiten: Bedingungen für den Repulsionsassay

Der Repulsionsassay ist für den Erfolg dieser Arbeit von essentieller Bedeutung. Daher waren vorab die besten Bedingungen zum Beobachten der Nervenfasern zu definieren. Hierzu wurde zum einen das beste Wachstumsmedium gesucht und zum anderen die passende Konzentration an Semaphorin 3F.

Da das Glutamax/F12 Medium, in dem die Ganglien auswachsen, mit Phenolrot gefärbt und Carbonat gepuffert ist, eignet es sich nur bedingt für Aufnahmen unter dem Mikroskop, weil zwar die Temperatur von 37°C eingestellt ist, eine Begasung mit CO₂ aber nicht möglich war. Als Alternativen wurden sowohl PBS als auch Krebs-Ringer Lösung getestet.

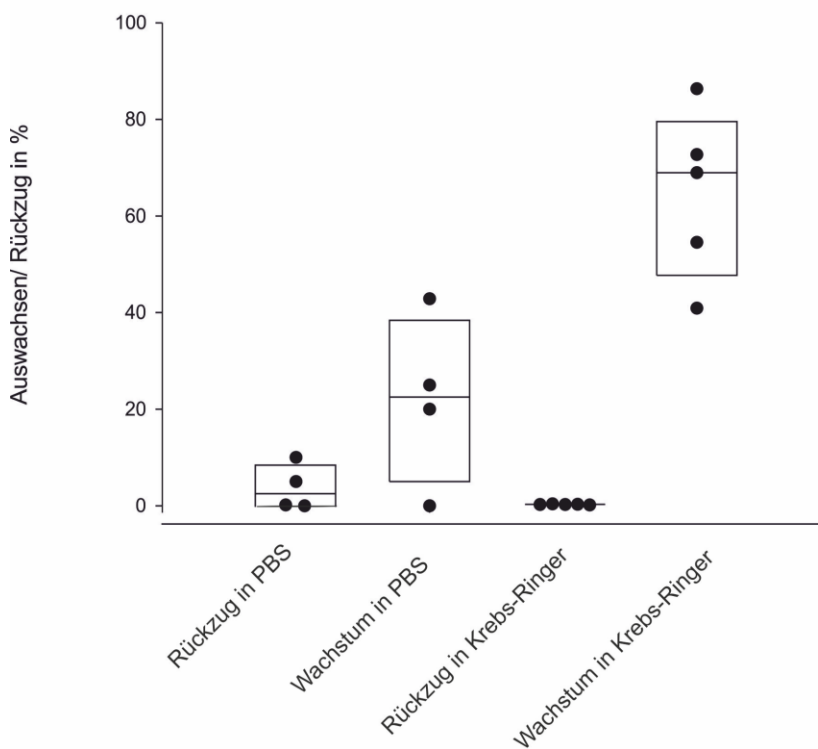


Abbildung 16: Vergleich PBS gegen Krebs-Ringer Lösung

Im direkten Vergleich zwischen den beiden Puffern sieht man sowohl weniger Rückzug als auch mehr Auswachsen bei der Krebs-Ringer-Lösung im Gegensatz zum PBS. Der Krebs-Ringer-Puffer stellt also das bessere Medium für die Aufnahmen unter dem Mikroskop dar.

Ein Punkt steht für einen Versuch im Repulsionsassay. Im Box Plot sind Median sowie 25% und 75% Perzentile angegeben.

Hier stellte sich die Krebs-Ringer-Lösung als bessere Alternative dar. Sie verbesserte das Wachstum deutlich, und es kam zu keinem spontanen Rückzug, sodass der später ausgelöste Rückzug allein auf das Semaphorin 3F zurückzuführen ist.

Zweitens ging es darum die für diese Versuche passende Konzentration an Semaphorin 3F zu finden. Aus vorherigen Veröffentlichungen ist der wirksame Konzentrationsbereich bekannt [Fassold A, 2009]. Daher war es ausreichend eine mittlere (100 nmol/l) und eine hohe (210 nmol/l) Konzentration aus dem Wirkungsbereich miteinander zu vergleichen.

Hier stellte sich heraus, dass die Konzentration von 210 nmol/l den besseren Rückzug bewirkt, ohne die Zellen nachhaltig zu schädigen.

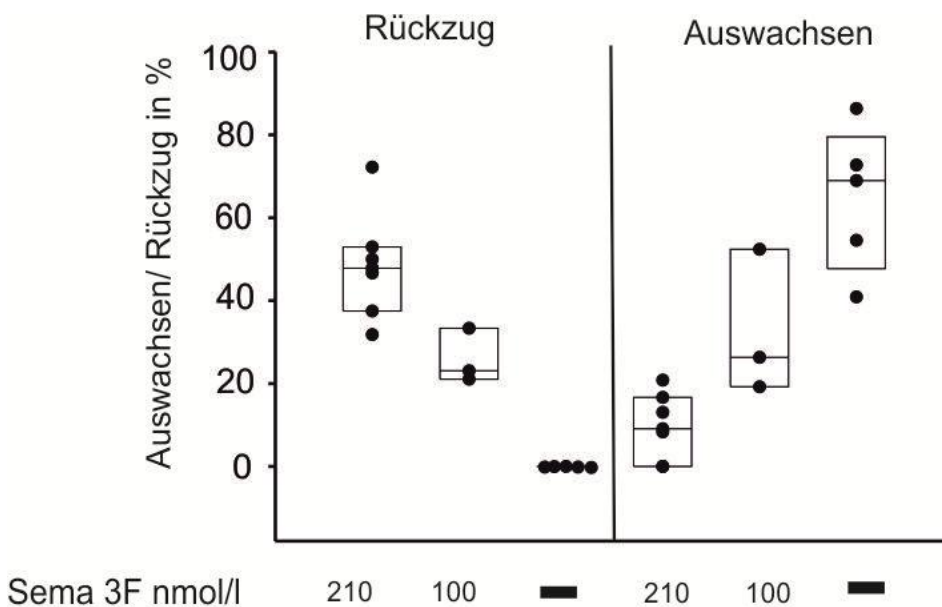


Abbildung 17: Vergleich Rückzug bei 100 nmol/l gegen 210 nmol/l Semaphorin 3F

Der Rückzug bei 210 nmol/l liegt bei etwa 50% gegen 23% bei 100 nmol/l Semaphorin 3F. Das Auswachsen verringert sich von 25% auf 10%, ist aber noch existent, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Zellen individuell auf Semaphorin 3F reagieren und die Reaktion spezifisch ist.

Ein Punkt steht für einen Versuch im Repulsionsassay. Im Box Plot sind Median sowie 25% und 75% Perzentile angegeben.

Abkürzungen: Sema: Semaphorin

3.2 Polyklonale Antikörper gegen Plexin A2 und Neuropilin-2 im Repulsionsassay

Als erstes wurden käufliche polyklonale Antikörper der Firma R+D systems gegen die beiden Rezeptorbestandteile Plexin A2 und Neuropilin-2 im Repulsionsassay eingesetzt. Zum Einsatz kamen der anti-human/mouse/rat Plexin A2 Antikörper (AF 5486) und der anti-mouse/rat Neuropilin-2 Antikörper (AF 567).

Mit beiden Antikörpern ist eine statistisch signifikante Reduktion der durch Semaphorin 3F ausgelösten Repulsion zu beobachten (Abbildung 18). Wobei der Neuropilin-2 Antikörper in etwa doppelt so hoher Konzentration eingesetzt werden musste, und die erzielte Hemmung der Repulsion nicht ganz so stark war. Der maximale Effekt der Neuropilin-2 Antikörper lag bei einer Verminderung der Repulsion von 60% auf etwa 30%. Der Plexin A2 Antikörper hingegen konnte die Repulsion in der höchsten Konzentration nahezu vollständig verhindern (Abbildung 18).

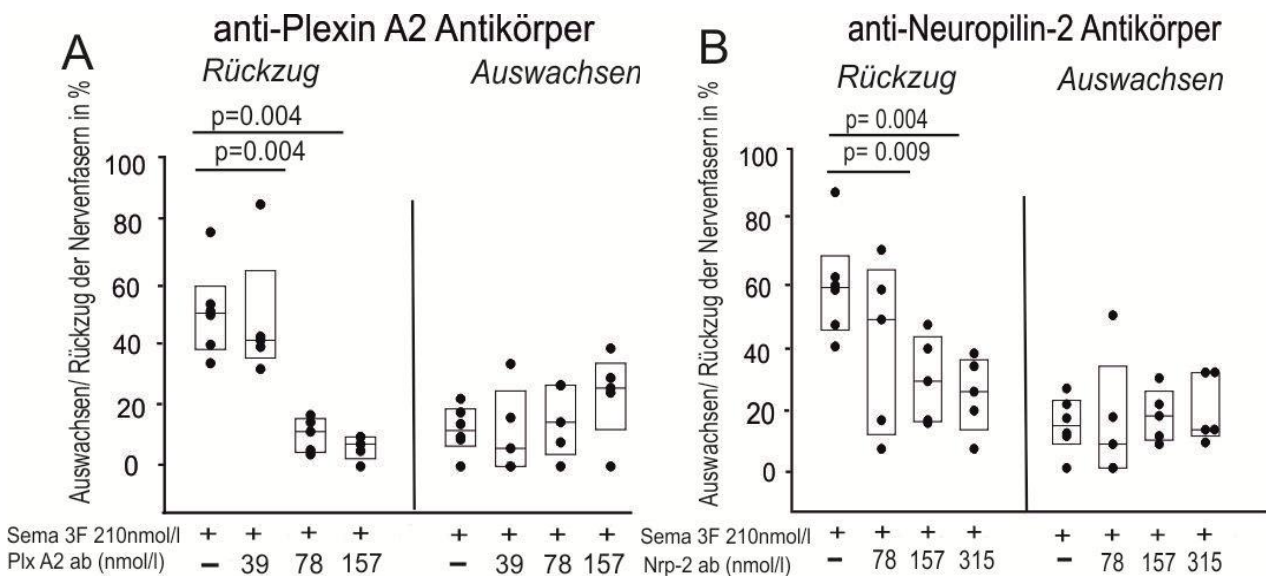


Abbildung 18: Anti-Plexin A2 und Anti-Neuropilin-2 Antikörper im Repulsionsassay

In beiden Graphiken wurde der Rückzug der Nervenfasern mit 210 nmol/l Semaphorin 3F ausgelöst. Die zugegebene Menge an Antikörper wurde in ansteigender Konzentration eingesetzt. Auf der linken Seite findet sich der Rückzug im Gegensatz zum Auswachsen auf der rechten Seite. A: Der anti-Plexin A2 Antikörper B: Der anti-Neuropilin-2 Antikörper

Ein Punkt steht für einen Versuch im Repulsionsassay. Im Box Plot sind Median sowie 25% und 75% Perzentile angegeben.

Abkürzungen: Plx: Plexin; Nrp: Neuropilin; Sema: Semaphorin

3.3 Polyklonale Antikörper gegen Plexin A2 und Neuropilin-2 im Kollagen-induzierten Arthritis Mausmodell

Durch die guten Ergebnisse im Repulsionsassay bestärkt, wurden die beiden Antikörper auch im Tier eingesetzt um herauszufinden, ob sich ein Einfluss auf die Entwicklung der CIA finden lässt.

Der Schwerpunkt wurde hierbei erst einmal auf den anti-Plexin A2 Antikörper gelegt, da dieser im Repulsionsassay die besseren Ergebnisse erzielt hatte. Für den erfolgreichen Einsatz im Mausmodell sind zum einen die therapeutische Dosis, der richtige Zeitpunkt der Behandlung und die Art der Applikation entscheidend. Da bereits Antikörper zur Therapie der RA eingesetzt werden, kann man diese Dosierung als Anhaltspunkt nehmen. Hierzu zwei Beispiele: Adalimumab wird in einer Einzelinjektion von 40mg alle 3-4 Wochen gegeben, und Eternercept in einer Dosis von 50mg alle 1-2 Wochen injiziert [van Herwaarden N, 2015].

Dies entspricht, geht man von einem 75 kg schweren Patienten aus, einer Dosis von 0,53 mg/kg bei Adalimumab und einer Dosis von 0,67 mg/kg bei Etanercept. Im Allgemeinen dosiert man die Antikörper in der Maus ein wenig höher, als sie dann später im Menschen eingesetzt werden. Für Adalimumab wurden Dosen zwischen 1-10 mg/kg in der Maus eingesetzt. Hier ist nun eine Dosierung zu finden, die wirtschaftlich ist und einen therapeutischen Effekt verspricht. Entschieden wurde, dass mit einer Dosierung von etwa 1-2mg/kg begonnen wird. Bei einer Maus mit 8-10 Wochen ist ein Gewicht von 20-25g normal. Den Mäusen wurde also eine Dosis von 25µg bzw. 50µg injiziert. Da es sich um einen artfremden (*goat*) polyklonalen Antikörper handelt, ist eine mehrmalige Gabe ausgeschlossen, da es beim zweiten Mal zu einer deutlichen Immunreaktion kommen könnte.

Der nächste Punkt ist die Applikation. Hier ist die gängigste Form eine intraperitoneale Injektion; es ist aber auch eine intravenöse Injektion möglich [Kanakaraj P, 2012]. Für den Zeitpunkt der Behandlung ist eine frühe Behandlung sinnvoll, da der Rückzug der Nervenfasern verhindert werden soll. Andererseits ist für den therapeutischen Einsatz eine Gabe nach Ausbruch der Krankheit relevant. Es wurden daher zwei Zeitpunkte gewählt: Einmal eine präventive Gabe am Tag 4 nach Immunisierung der Tiere (Abbildung 19) und eine therapeutische Gabe ab dem ersten Auftreten der Arthritis Symptome, das heißt ab einem klinischen Score von 6 Punkten (Abbildung 20).

Die Kontrollgruppe erhielt unspezifische goat IgG-Antikörper zum selben Zeitpunkt, um Effekte des Antikörpers auszuschließen.

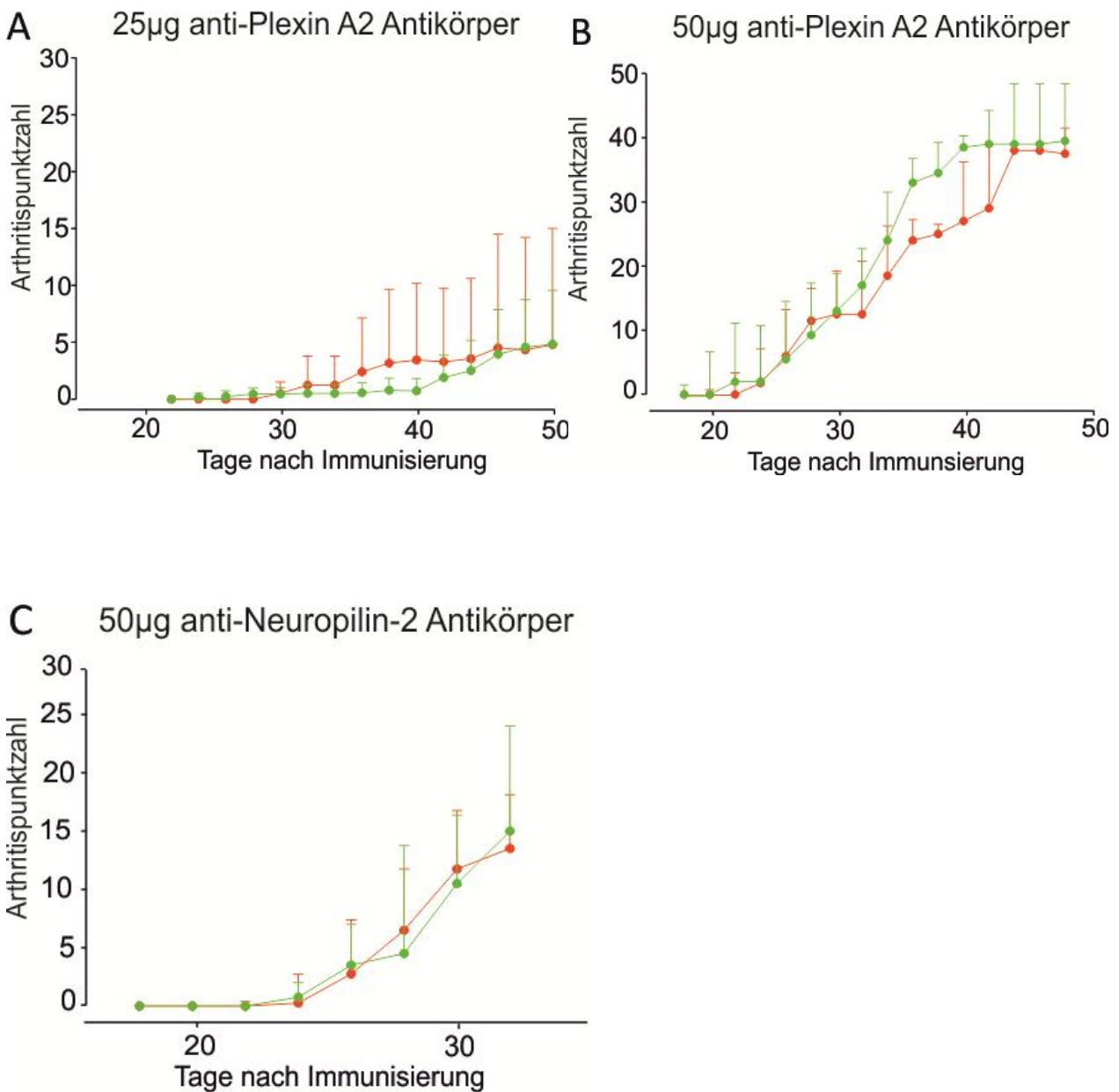


Abbildung 19: Präventive Gabe der Antikörper am Tag 4 nach der Immunisierung.

Die rote Kurve stellt die mit dem jeweiligen Antikörper behandelten Tiere dar. Die grüne Kurve stellt die Kontrollgruppe dar, die unspezifische goat IgG-Antikörper in entsprechender Menge erhielt. Der Antikörper wurde intraperitoneal injiziert.

A: 25µg anti-Plexin A2 Antikörper (rot) und 25µg normal goat IgG (grün), n=8 Mäuse pro Gruppe

B: 50µg anti-Plexin A2 Antikörper (rot) und 50µg normal goat IgG (grün), n=16 Mäuse pro Gruppe

C: 50µg anti-Neuropilin-2 Antikörper (rot) und 50µg normal goat IgG (grün), n=8 Mäuse pro Gruppe

Der Punkt zeigt den Median und die Fehlerbalken zeigen das 75% Quartil.

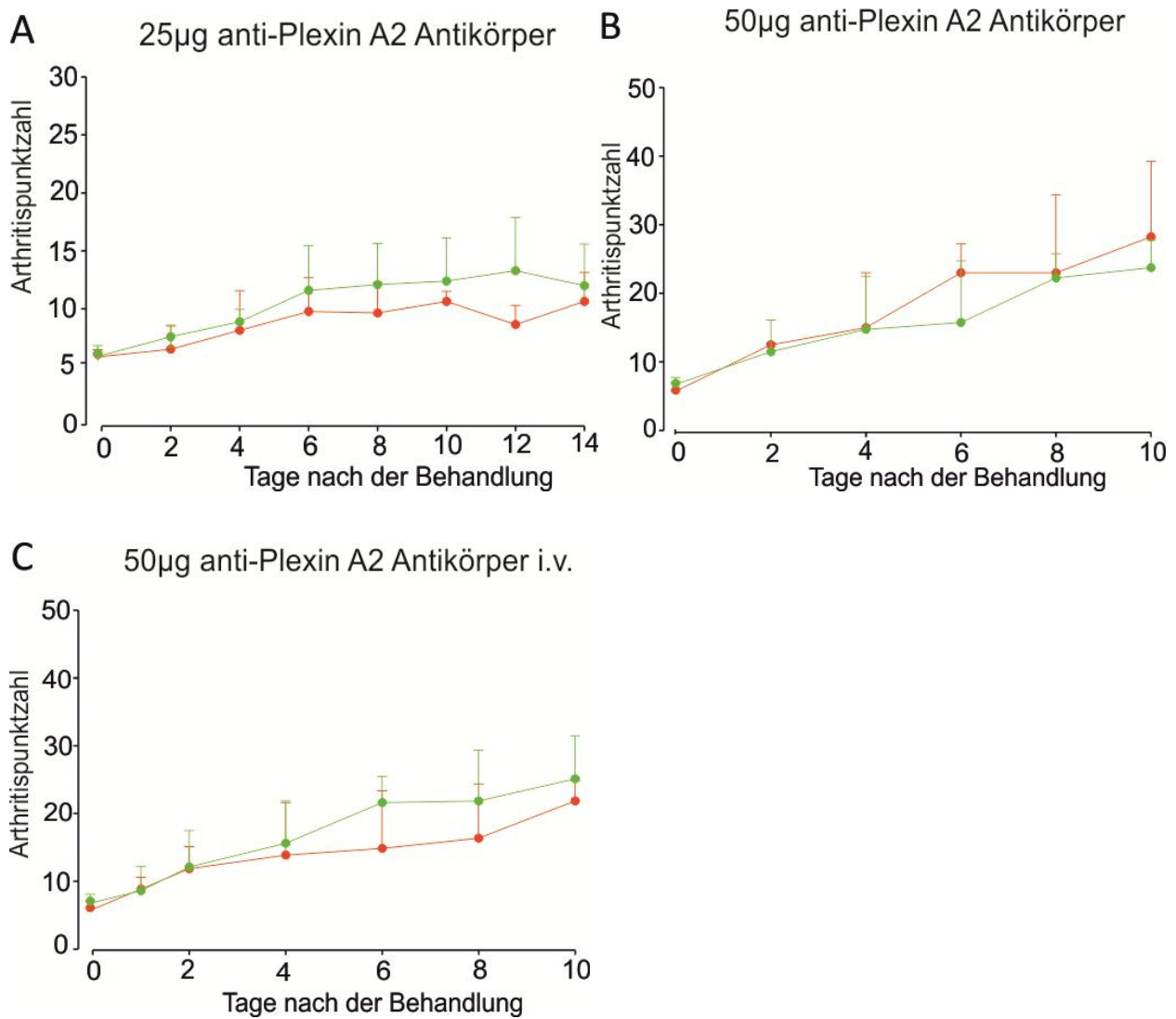


Abbildung 20: Therapeutische Gabe der Antikörper ab Arthritiscore 6

Die rote Kurve stellt die mit dem jeweiligen Antikörper behandelten Tiere dar. Die grüne Kurve stellt die Kontrollgruppe dar, die unspezifische normal goat IgG-Antikörper in entsprechender Menge erhielt. Beim Versuch C wurde den Mäusen der Antikörper intravenös injiziert.

A: 25µg anti-Plexin A2 Antikörper (rot) und 25µg normal goat IgG (grün), n=8 Mäuse pro Gruppe

B: 50µg anti-Plexin A2 Antikörper (rot) und 50µg normal goat IgG (grün), n=16 Mäuse pro Gruppe

C: 50µg anti-Plexin A2 Antikörper (rot) und 50µg normal goat IgG (grün), intravenös injiziert n=8 Mäuse pro Gruppe

Der Punkt zeigt den Median und die Fehlerbalken zeigen das 75% Quartil.

Die abgebildeten Versuche bilden ein breites Spektrum an verschiedenen Therapiemodellen ab. Allerdings war bei keinem Versuche eine signifikante Veränderung der Arthritissymptome festzustellen. Da die therapeutischen Möglichkeiten mit einem polyklonalen Antikörper begrenzt sind und auch der Tierschutzaspekt eine Rolle spielt, wurde von weiteren Versuchen Abstand genommen.

3.4 Blockende Peptide aus dem Phage display

Es wurden am Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie drei Proteine im Phage display untersucht. Ausgewählt wurden: Das humane Plexin A2 isoliert aus Weizenkeimen (Abnova, H00005362-P01), das humane Neuropilin-2/Fc aus Myelomzellen der Maus (R+D, 2215-N2) und der polyklonale Plexin A2 Antikörper (R+D, AF5486). Die beiden Proteine stellen den Rezeptorkomplex dar, dessen Signaltransduktion antagonisiert werden soll. Der Antikörper wurde aufgrund seiner hervorragenden, hemmenden Wirkung im Repulsionsassay ausgesucht.

Da aus dem Phage display eine große Anzahl an bindenden Peptiden zu erwarten ist, ist es zu empfehlen diese Sequenzen auf Ähnlichkeit untereinander zu prüfen, da ähnliche bindende Sequenzen immer auf einen *Hot spot* des Zielproteins hinweisen können. Zum zweiten ist ein Vergleich dieser ähnlichen Peptide mit der Sequenz des natürlichen Liganden sinnvoll, um die physiologische Bindungsstelle zu finden und so blockieren zu können. Im Folgenden wurden die gefundenen Sequenzen nach Ähnlichkeit sortiert und mit der Sequenz des physiologischen Bindungspartners des Proteins verglichen.

3.4.1 Plexin A2 Protein

Im Phage display wurden folgenden Sequenzen gefunden, die an das humane Plexin A2 binden.

Sequenzen nach Ähnlichkeit:

P2.1	RWRRVMLCLRCAWVD	P2.01	RWRRVMLCLRCAWVD
P2.26	RWRSNLRVLMNAKGV	P2.02	RFSKFWLNGRPPGSR
P2.14	RHGGSVLSVYALGI	P2.03	RDIATNSSLLVSGPL
P2.22	SRRPTAVVCVITXIN	P2.04	SIGYMMIWVGDALAH
P2.34	SVRISRSFLVQAIGH	P2.05	RMDLGGISYAGAACT
P2.4	SIGYMMIWVGDALAH	P2.06	RGKVGLDKINGAFGN
P2.30	RSGCPLSVLSKAFAY	P2.07	SLKLGAYYQDGPGMR
P2.31	RRWYSMYGYSKQAR	P2.08	RTLKQYIAPSTALGT
P2.12	RDSGGGGLLSGARVR	P2.09	RESYDVGRGQTSLCA
P2.28	RGALRGFSNGPALNI	P2.12	RDSGGGGLLSGARVR
P2.5	RMDLGGISYAGAACT	P2.13	RNLVRNKMWSYARMH
P2.13	RNLVRNKMWSYARMH	P2.14	RHGGSVLSVYALGI
P2.8	RTLKQYIAPSTALGT	P2.17	SCAAMMCACGPVG
P2.36	RGMHGLWWRFKPRLV	P2.18	SLCWAASDFRNSLYA
P2.6	RGKVGLDKINGAFGN	P2.22	SRRPTAVVCVITXIN
P2.17	SCAAMMCACGPVG	P2.24	SLFLFLISGGRSSLG
P2.7	SLKLGAYYQDGPGMR	P2.25	RLWQFSHTPGSSCCS
P2.33	RWHLAWWRLG PATP	P2.26	RWRSNLRVLMNAKGV
P2.2	RFSKFWLNGRPPGSR	P2.27	SVDLKPSGGVSMPL
P2.35	SFLRFWRGRCMAAYS	P2.28	RGALRGFSNGPALNI
P2.18	SLCWAASDFRNSLYA	P2.30	RSGCPLSVLSKAFAY
P2.24	SLFLFLISGGRSSLG	P2.31	RRWYSMYGYSKQAR
P2.27	SVDLKPSGGVSMPL	P2.33	RWHLAWWRLG PATP
P2.25	RLWQFSHTPGSSCCS	P2.34	SVRISRSFLVQAIGH
P2.9	RESYDVGRGQTSLCA	P2.35	SFLRFWRGRCMAAYS
P2.3	RDIATNSSLLVSGPL	P2.36	RGMHGLWWRFKPRLV

Anschließend wurden die gefundenen Sequenzen auf Plausibilität geprüft, indem sie mit den Sequenzen der natürlichen Liganden abgeglichen wurden. Für Plexin A2 kommen hier das Neuropilin-2 und das Semaphorin 3F in Frage, da beide an Plexin A2 binden können. Es haben sich folgende Ähnlichkeiten gefunden.

Das humane Neuropilin-2

```
hu_Neuropilin-2 (393)      APLLTRFVRI RPQTWHSGIALRLELFGCRVTDAPCSNMLGML
Translation of P2.25 (1)  -----RLWQFSHTPGSSCCS-----
Translation of P2.5#2 (1) -----RMDLGGISYAGAACT-----
Consensus (393)          RLDLFG S A A CS
```

```
hu_Neuropilin-2 (540)      DPRTQQPKLFEGNMHYDTPDIRRFDPIPAQYVRVYPE
Translation of P2.3#2 (2)  DIATNSSLLVSGPL-----
Translation of P2.7#2 (1)  ---SLKLGAYYQDGPGR----
Consensus (540)          D TN L G LH D P IR
```

```
hu_Neuropilin-2 (834)      YVMAAGGAVLVLVSVVALALVLHYHFRFYAAKKTDHSI
Translation of P2.30 (1)  --RSGCPLSVLSKAFAY-----
Translation of P2.4#2 (1)  -SIGYMMIWGDALAH-----
Consensus (834)          A G MLILVS ALAH
```

Das humane Semaphorin 3F

```
semaphorin-3F (625)      ECQPRSPQATVKWLFQRDPGDRRREIRAEDRFLRTEQGLLLRALQ
Translation of P2.12#2 (1) -----RDSGGGLLSGARVR-----
Translation of P2.22 (1)  -----SRRPTAVVCVITXIN-----
Translation of P2.35 (1)  -----SFLRFWRGRMAAYS-----
Consensus (625)          F RDPGGR LLI A R
```

```
semaphorin-3F (351)      RNPVIYAVFTSSGSVFRGSAVCVYSMADIRMVFNGPFAHKE
Translation of P2.22 (1)  -----SRRPTAVVCVITXIN-----
Translation of P2.35 (1)  -----SFLRFWRGRMAAYS-----
Consensus (351)          S S FRGA VCVYS
```

```

semaphorin-3F (589)      AAFLECQPRSPQATVKWLFQRDPGDRRREIRAEDRFLRTEQGL
Translation of P2.2#2 (1)  ---RFSKFWLNGRPPGSR--
Translation of P2.25 (1)  ----RLWQFSHTPGSSCCS-----
Consensus (589)          SK WLF R PGSR
semaphorin-3F (589)      AAFLECQPRSPQATVKWLFQRDPGDRRREIRAEDRFLRTEQGL
semaphorin-3F (589)      AAFLECQPRSPQATVKWLFQRDPGDRRREIRAEDRFLRTEQGL

```

Es wurden die Peptidsequenzen, die Ähnlichkeiten zu Neuropilin-2 oder Semaphorin 3F zeigten, unter der jeweiligen Sequenz angeordnet. So kann man die Anzahl der gleichen oder auch nur in ihren chemischen Eigenschaften ähnlichen Aminosäuren bestimmen. Es gibt verschiedene Aminosäuren, die zum Beispiel saure, basische oder eher lipophile Eigenschaften besitzen und in ihrer Funktion im Protein teilweise austauschbar sind. Für diese Arbeit ist ein geschultes Auge nötig, sodass sie daher unter Anleitung von Dr. Michael Szardenings durchgeführt wurde.

In dieser Aufstellung sieht man gerade für den letzten Vergleich mit Semaphorin 3F eine starke Übereinstimmung. Die entsprechende Sequenz ist in orange dargestellt. Die anderen Vergleiche, auch die mit dem Neuropilin-2, sind eher wenig überzeugend.

3.4.2 Neuropilin-2 Protein

Im Phage display wurden folgenden Sequenzen gefunden, die an das humane Neuropilin-2 binden.

Sequenzen nach Ähnlichkeit:

N2.1	SKHDLPAKPPFNFA	N2.35	RSTGHGMVALACFV
N2.25	RISEDLAKSFESFVT	N2.29	RIGAFVEAGQQAQFGR
N2.19	RTVLCSCCRYWTLDP	N2.23	RGSLVWCAVKLALSG
N2.22	RYMWTGDRVVRTKY	N2.5	RRGVDGVHVSIAGSG
N2.3	RLDWRPSGVNAVCA	N2.34	REGGMDFDVLGPGNP
N2.13	SGCTRSVRLFRTGGA	N2.2	RPATAVMYCYSSPC
N2.28	RCCCALRLYAATVSI	N2.26	SQAYDYHADSSSSCC
N2.24	RSGSVLRLSIAVPN	N2.30	SFMGMAIVYTTTFC
N2.18	SYGRLLHSRAGAVKC	N2.31	SVRGAAMDTSPPRY
N2.4	STGRCVDMRWSAFSS	N2.20	SIVVKLAGGIVPHTS
N2.8	SATRPMASLSLAMNH	N2.6	RGVVGISGSVGAMMS
N2.14	RSNGSGVRFGRALRT	N2.33	SDGVSLASIVTQPY

Es fallen ungewöhnlich viele Cysteine in Clustern wie CXCC, CCC u.ä. auf. Solche Strukturen gibt es in erster Linie im Semaphorin 3F. Von der Synthese dieser Sequenzen ist aber trotzdem eher abzusehen, weil sich diese Peptide schlecht renaturieren lassen und unter Umständen Multimere bilden können.

Bindungspartner für Neuropilin-2 kann sowohl Plexin A2 als auch Semaphorin 3F sein. Es wurden daher beide Protein mit den gefundenen Peptidsequenzen verglichen.

Das murine Semaphorin 3F

```

muSemaphorin_3F (151)    AQALPWTQMQVVRGRGSRATDGADRPTPTAPRQDYIFYLEPEKLESG
Translation of N2.31 (1) ----- SVRGGAAMDTSPRYY-----
Translation of N2.6 (1)  -----RGVVGISGSVGAMMS-----
Consensus (151)                RG  AIDGS  R    S
Translation of N2.31 (1) ----- SVRGGAAMDTSPRYY-----

```

muSemaphorin_3F (351) RNPVIYAVFTSSG**SVFR**GS**AVCVYS**MADIRMVFNGPF**AHKEGPNY**
 Translation of N2.21 (1) -----R**SGSVLR**-LSIAVP**NSSD**-----
 Translation of N2.8 (1) -----S**ATRPMASL**SLAMNH-----
 Consensus (351) SGSV R LAI V AM
 Translation of N2.21 (1) -----R**SGSVLRLS**IAVP**NSSD**-----

muSemaphorin_3F (510) VEVFKEPAPVK**TMT**ISSKRQQLY**VASAVGV**THL**SLHRCQ**AYGAACAD
 Translation of N2.20 (1) -----SIVV**KL**AG**GI**V**PTHS**-----
 Translation of N2.33 (1) -----SD**GV**SLASIV-T**QPY**
 Consensus (501) I V A GVS SI Q Y

muSemaphorin_3F (601) FNSNANKNA**VE**SVQY**GVAGS**AAFLE**CQPRSPQ**ATVKWLFQ**RDP**
 Translation of N2.34 (1) -----REG**GMDFDV**L**GP**GNP-----
 Translation of N2.5 (1) -----RR**GDGVHVS**I**AGSG**-----
 Consensus (601) K AVDGV F VAGSG
 Translation of N2.34 (1) -----R**EGGMDFDV**AG**SGNP**-----

Das murinem Plexin A2

muPlexinA2 (150) EPSHKKEHYLSSV**NKT**GTMYGVIVRSEGEDGKLF**IGTAV**DGKQDY**FPT**
 Translation of N2.29 (1) -----R**IGAFVE**AG**QQA**FGR
 Translation of N2.4 (1) -----ST**GRCVDMRWS**A**FSS**
 Consensus ----- IG VDAKQ AF S
 Translation of N2.29 (1) -----R**IGAFVE**AG**QQA**FGR

muPlexinA2 (736) GYECVLSIQGAVHRVPALRFN**SSSVQCQ**NSSYQYDGMDISNLAV**DFAVVW**NGNFIIDN
 N2.30 (1) -----SF-**MGMA**IVYTT**FC**
 N2.34 (1) -----REG**GMDFDV**L**GP**GNP
 Consensus (736) AMDFAVVW GNF

Zufriedenstellende Übereinstimmungen sind in orange dargestellt. Durch die Anhäufung von Cysteinen und die häufig vorkommenden positiv geladenen Aminosäuren sind diese Peptide nur bedingt für eine Synthese geeignet.

3.4.3 Anti-Plexin A2 Antikörper

Zuletzt wurde der anti-Plexin A2 Antikörper im Phage display untersucht. Folgende Sequenzen binden an den Anti-Plexin A2 Antikörper.

Sequenzen nach Ähnlichkeit:

C2.1	RSEGKLRITLCSG	E2.1	GYVNSVFLEAPWQQQEA
C2.10	SVPSGMRVGFSSVFL	E2.10	GVPQCQEVNRQILFYVC
C2.11	SIKGASMVKPYTSRI	E2.11	GEHNCSLYTSTWHDKLI
C2.14	RLREMGFYCLDAGLS	E2.12	NRVCWYYERVCNYSPC
C2.15	RMSCYGVGIGSTLSD	E2.13	GWAVSVNVIYTPVIPFF
C2.16	SFAGWLSLMLRATII	E2.14	GVGQCIEWQKYWDQTYN
C2.17	RGAAHKLTIIYKAILL	E2.15	GVGTSPWNATIIFLFC
C2.19	SFSHWKIRWRVTPVI	E2.16	GIPFCERTIDCYNLIQD
C2.2	RWSVFWNIGGVTVRD	E2.18	GYEFCFDKWTHCQTLQF
C2.20	RGSARMLRNSILC	E2.2	YFMCPSSEFCSRHYVIF
C2.21	RCVLNARRKSGSVVN	E2.20	GHYNCPGFQRYWLPVTF
C2.22	SVHAGQGCACHG	E2.21	GIENCEEPSDPKTGED
C2.23	SSLRGVGHSTSACRA	E2.22	GYLSSVRATVQYETRLF
C2.24	RDAVAIVMGWAACKG	E2.23	GRSMCVQTESSELRYLN
C2.25	RQGRILNRSRGPDT	E2.24	GEWRCVKLTRKICPPCD
C2.27	RWSWSDLSLWSTYGV	E2.25	GPHFCPWXYDYRYNLRA
C2.29	SSIFCGMGCWTTCEI	E2.26	GDESCGNEXGVYKYVI
C2.3	SKDMLHGVGIPYRG	E2.29	GPYASWLHYHDCADAAC
C2.30	SVACRSRARGSSRCH	E2.30	GKYMCCVVHEKHESNRCY
C2.31	RGGTIAAGVTTSGRD	E2.32	GANTSQHAVFCCEVYVD
C2.32	SVLARGVVRGWASEF	E2.35	GPHTSSLSNFEPESAQA
C2.34	SLGLEVKYVSKTCCF	E2.4	GTEQVCDVVAHDQYVSSA
C2.4	RCSMPSWGPGGASGG	E2.5	VKFCSHHKAFIFAICI
C2.5	RMCSQWAPCSITIWD	E2.6	GNNRSFEQKRHRRTTQQA
C2.6	RAQISDETSALPRGS	E2.7	GYKASHVYHEYEFFHHF
C2.9	SFSHWKIRWRVTPVI	E2.8	GIKVCWRGNVEIEQPKD

Bindungspartner für den Antikörper ist das murine Plexin A2. Es wurden die Peptide mit diesem Protein verglichen.

Das murine Plexin A2

```

muPlexinA2          LDAVYKNVPYSQRPRAVDMDLEWRQGRIARVVLQDEIDITTKIEGD
Translation of C2.25 (1) -----GELGWRQGRILNRSRGP-DT
Translation of E2.24 (1) -----GEWRQVCLTRKICPPCD
Consensus (1520)          EWRQGRI RKI  P
muPlexinA2          LDAVYKNVPYSQRPRAVDMDLEWRQGRIARVVLQDEIDITTKIEGD

muPlexinA2 (1667)    GDQKEGDRGSKMVSEIYLTRLLATKGTQLQKFVDDLFETLFST
Translation of C2.17 (1)  --GELGWRGAAHKLTIYKAILL-----
Translation of E2.22 (2)  -----GYLSSVRATVQYETRLF-----
Consensus (1667)          G RGS  S IY TRLL
muPlexinA2 (1667)    GDQKEGDRGSKMVSEIYLTRLLATKGTQLQKFVDDLFETLFST

muPlexinA2 (932)    CKPEFMTKSHQQYTFVNPSVLSLSPIRGPESGGTMVTITGHYLG
Translation of C2.32 (1)  -----SVLARGVVRGWASEF-----
Translation of E2.35 (1)  -- -----GPHTSLSLNFEPESAQA-----
Consensus (932)          PSVLSLS IRGPESA
muPlexinA2 (932)    CKPEFMTKSHQQYTFVNPSVLSLSPIRGPESGGTMVTITGHYLG

muPlexinA2 (751)    PALRFNSSSVQCQNSSYQYDGMDISNLAVDFAVWNGNFIIDNPQDLKVH
Translation of E2.8      -----GIKVCWRGNVEIEQPKD-----
Consensus (751)          V W GN  IDNP D
muPlexinA2 (751)    PALRFNSSSVQCQNSSYQYDGMDISNLAVDFAVWNGNFIIDNPQDLKVH

muPlexinA2 (1297)    QTDINELTSDLDRSGIPYLDYRITYAMRVLFPGIEDHPVLELE
Translation of C2.3#2 (1)  -----S-KDMLHGVGIPYRG-----
Translation of C2.6#2 (1)  RAQISDETSALPRGS-----
Consensus (1297)          I D TS L R GIPY
muPlexinA2 (1297)    QTDINELTSDLDRSGIPYLDYRITYAMRVLFPGIEDHPVLELE
Section

```

760

```

muPlexinA2 (736)          LSIQGAVHRVPALRFNSSSVQCQNSSYQYDGMDISNLAVDFAVV
Translation of E2.2 (1)  -----GYFMCPSEFCSRHVYIF-----
Translation of E2.23 (1)  ' -----GRSMCVQTESESELRYLN-----
Translation of E2.23 (1)  ' -----GRSMCVQTESESELRYLN-----
Consensus (736)          F S SVQC S Y Y

```

Die in orange dargestellten Übereinstimmungen sind in diesem Fall besonders überzeugend. Um dieses Ergebnis abzusichern wurde ein zweites Phage display mit einer anderen neueren Bibliothek durchgeführt. Die verwendete Bibliothek enthält mehr Phagen und lässt etwas längere Sequenzen zu. Die gefundenen Peptide weisen alle auf dieselbe Sequenz des Plexin A2 hin und sind im Vergleich zum Protein dargestellt.

1020

```

muPlexinA2          VDRARVDSSLQFEYIDDPRVQRIEPEWSITSGHTPLTITGFNLDVIOEPRVRVKF
huPlexin-A2         VDRAHVDSNLQFEYIDDPRVQRIEPEWSIASGHTPLTITGFNLDVIOEPRIRVKF
*plxNc7.pro         -----YDSSDQFSFDYELE-QN
*plxNc28.pro        ----- WDSSIQFSFEKDKE--RI
plxNc54             --Y-NHSSAYQFFEPYLAY
plxNc55             ----H-SNSSTY-FRYEP-----Y--Y--FY
plxNc56             --N-HWSSADQFKYEEE---V--A
plxNc4.pro          --R-DSSYEFQYEEDE----V--Y-16
plxNc15.pro         -----NFWSTQNVDVEQ-----F--H--GY
plxNc55             ----H-SNSSTY-FRYEP-----Y--Y--FY
plxNc9.pro          -----HTRSNINID-----VGQA-----I--L--D
plxNc21             ----H-DTSLIFNYFIDERK
plxNc10.pro         ----DLTCLNQDIGYS-----QVS-16

```

Der Anti-Plexin A2 Antikörper kann sowohl an das murine als auch an das humane Plexin A2 binden. Da die Peptide sowohl im Tierversuch als auch als Therapie wirksam sein sollen, wurden hier auch das Plexin aus dem Menschen (grün hinterlegt) und aus der Maus (gelb hinterlegt) verglichen. Beide unterscheiden sich an der untersuchten Stelle nur in einer Aminosäure. Die Peptide, die die Sequenz des Plexin A2 am besten darstellen, sind rot dargestellt.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde eine Auswahl getroffen, welche Peptide synthetisiert und im Repulsionsassay getestet werden sollen. Hierbei wurde zum einen auf eine vielversprechende Ähnlichkeit zu dem Zielprotein Wert gelegt. Zum anderen wurde das Augenmerk auf eine gewisse Stabilität und Synthetisierbarkeit gelegt.

Aus diesem Grund wurde keines der Peptide aus dem Phage display mit dem humanen Neuropilin-2 ausgewählt.

Aus dem Phage display mit dem humanen Plexin A2 wurden zwei Peptide synthetisiert. Beide Peptide bilden dieselbe Sequenz aus Semaphorin 3F ab. Das eine (AV1) ist zehn Aminosäuren lang und das andere (AV2) ist mit sechzehn Aminosäuren ein wenig länger.

AV1

AV2

Ac-WLFQRDPGDR- NH2

Ac-QATVKWLFQRDPGDRR- NH2

Aus dem Phage display mit dem Anti-Plexin A2 Antikörper wurden, im Hinblick auf die Ergebnisse des zweiten Phage display, vier Peptide gewählt. Diese Peptide bilden eine Stelle des humanen und murinen Plexin A2 ab. Sie unterscheiden sich allerdings ein wenig in der Anordnung der Aminosäuren.

AcB13

AcB14

Ac-DSSDQFSFDYELEQN-NH2

Ac-DSSIQFFSFEKDKERI- NH2

AcB15

AcB16

Ac-DSSLQFEYIDDPR- NH2

Ac-DSSLQFEYIDDPRVQR- NH2

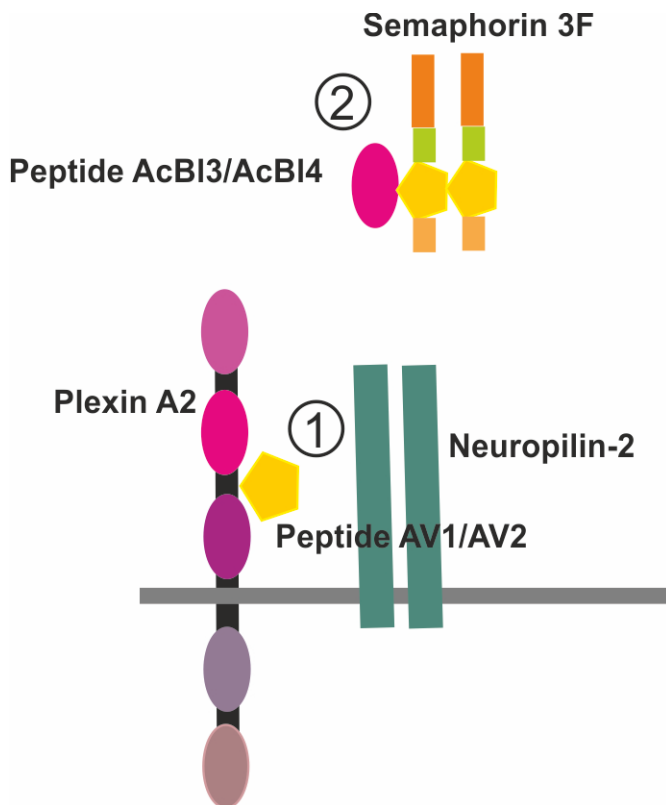


Abbildung 21: Schema der Eingriffsmöglichkeiten mit den Peptiden am Plexin A2 / Neuropilin-2 Rezeptor

1: AV1 und AV2 sind Semaphorin 3F-analoge Peptide, die durch Bindung an Plexin A2 eine Hemmung der Signaltransduktion bewirken können.

2: AcBI3 und AcBI4 sind Plexin A2- analoge Peptide, die am Semaphorin 3F binden. Dadurch ist der Ligand des Rezeptors blockiert und kann kein Signal mehr auslösen.

3.5 Blockende Peptide im Repulsionsassay

Die aus dem Phage display ausgewählten Peptide wurden zuerst in einer hohen Konzentration zusammen mit 210 nmol/l Semaphorin 3F im Repulsionsassay auf ihre Wirksamkeit getestet.

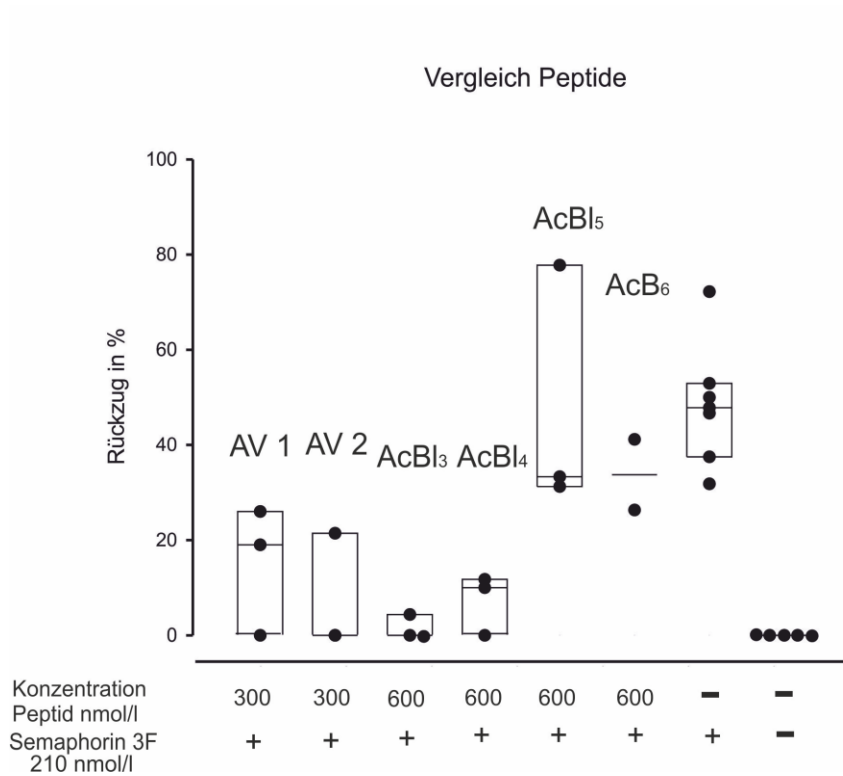


Abbildung 22: Nervenfaserrückzug bei Zugabe der synthetisierten Peptide im Vergleich

Bei AcBI3, AcBI4, AV1 und AV2 ist ein deutlicher Rückgang der durch Semaphorin 3F ausgelösten Repulsion festzustellen. AcBI5 und AcBI6 scheinen dagegen keinen Einfluss zu haben.

Ein Punkt steht für einen Versuch im Repulsionsassay. Im Box Plot sind Median sowie 25% und 75% Perzentile angegeben.

Mit den als effektiv betrachteten Peptiden wurden anschließend mehrere Konzentrationen getestet, um eine Dosis-Wirkungs-Beziehung herzustellen.

3.5.1 Semaphorin 3F Analoga AV1 und AV2 im Repulsionsassay

Zuerst wurde eine Konzentrationsreihe mit den beiden Semaphorin 3F Analoga AV1 und AV2 hergestellt. Hierbei wurde eine steigende Konzentration des Peptids zusammen mit der bekannten, rückzugauslösenden Konzentration von 210 nmol/l Semaphorin 3F eingesetzt. Man sieht bei beiden Peptiden eine konzentrationsabhängige Reduktion der Repulsion (Abbildung 23).

Getestet wurden die Konzentrationen 75 nmol/l, 150 nmol/l und 300 nmol/l. Bei AV1 ist in der höchsten Konzentration nur noch ein Rückzug von 10% zu verzeichnen (Abbildung 23). Bei AV2 reduziert sich der Rückzug bei 300 nmol/l auf nur noch 4%, das bedeutet eine nahezu vollkommene Aufhebung des Semaphorin 3F Effektes. Beide Peptide führen zu einer signifikanten Hemmung, wobei AV2 die deutlich bessere Wirksamkeit hat.

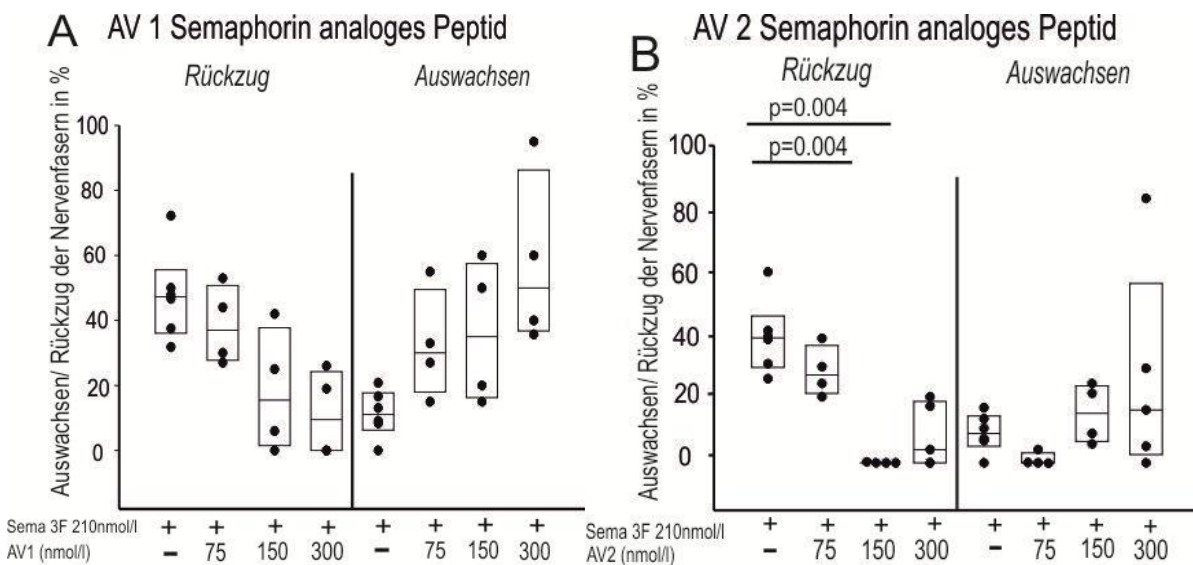


Abbildung 23: Nervenfaserrückzug bei Zugabe der Semaphorin 3F-analogen Peptide AV1 und AV2

A: AV1 blockiert den durch Semaphorin 3F ausgelösten Rückzug der Nervenfasern in der höchsten Konzentration signifikant. Dabei scheint sich auch die Auswachsrate bei erhöhter AV1 Zugabe zu verbessern.

B: AV2 hat noch einen deutlich besseren Effekt auf die Blockade des Rückzugs. In den beiden höheren Konzentrationen beträgt der Rückzug nur noch 0-4%

Semaphorin 3F wurde in allen Versuchen immer in der gleichen Konzentration von 210 nmol/l zugegeben.

Ein Punkt steht für einen Versuch im Repulsionsassay. Im Box Plot sind Median sowie 25% und 75% Perzentile angegeben.

Abkürzungen: Sema: Semaphorin

3.5.2 Plexin A2 Analoga AcB13 und AcB14 im Repulsionsassay

Desweiteren wurden die beiden im Vorversuch als wirksam betrachteten Plexin A2 Analoga AcB13 und AcB14 untersucht. Die Peptide wurden in den Konzentrationen 150 nmol/l, 300 nmol/l und 600 nmol/l eingesetzt. Semaphorin 3F wurde in der Konzentration von 210 nmol/l zugegeben. Beide Peptide zeigten eine signifikante Hemmung des Nervenfaserrückzuges (Abbildung 24). AcB14 reduzierte bei 600 nmol/l den Rückzug von 50% auf 5%. AcB13 ist sogar in der Lage, bei 600 nmol/l den Rückzug komplett zu verhindern.

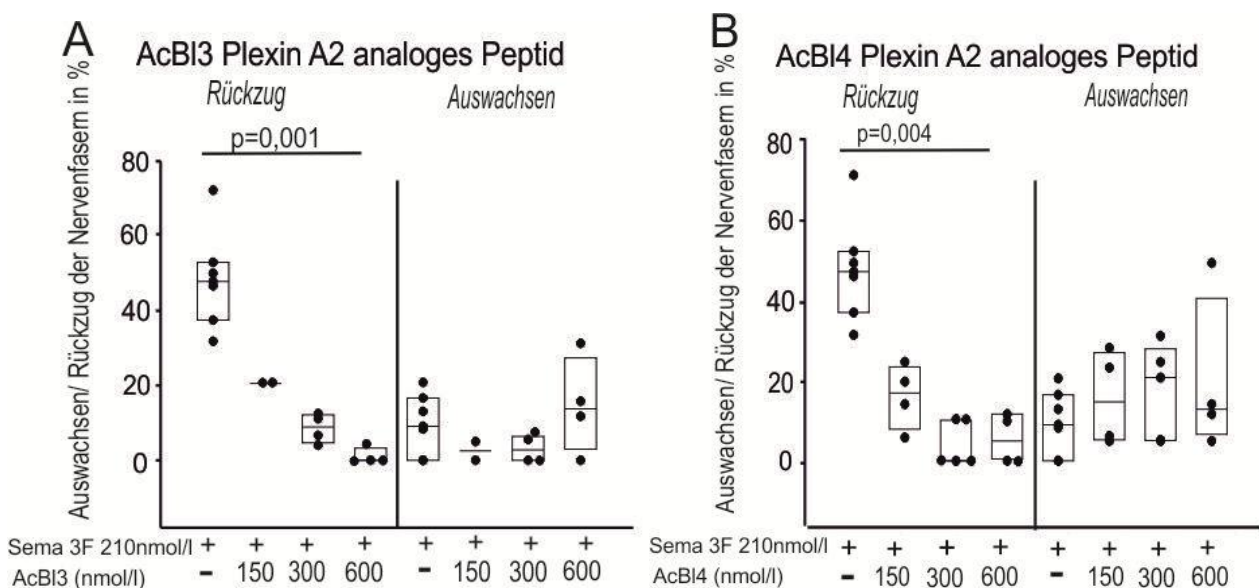


Abbildung 24: Nervenfaserrückzug bei Zugabe der Plexin A2- analogen Peptide AcB13 und AcB14

A: AcB13 konnte in der höchsten Konzentration den Rückzug der Nervenfasern nahezu vollständig verhindern.

B: AcB14 führte zu einer Senkung der Rückzugsrate in den höheren Konzentrationen auf 5%.

Semaphorin 3F wurde in allen Versuchen immer in der gleichen Konzentration von 210 nmol/l zugegeben.

Ein Punkt steht für einen Versuch im Repulsionsassay. Im Box Plot sind Median sowie 25% und 75% Perzentile angegeben.

Abkürzungen: Sema: Semaphorin

3.6 Bindungsfähigkeit und Nachweisbarkeit der Peptide

Die obigen Ergebnisse lassen natürlich hoffen, dass diese Peptide auch im Mausmodell eine ähnlich gute Wirkung erzielen wie im Repulsionsassay. Um die Peptide überhaupt im Tier einsetzen zu können, müssen aber einige Bedingungen erfüllt sein. Zum einen muss man eine Möglichkeit haben, die Peptide nachzuweisen, um überprüfen zu können, ob sie an den Wirkort gelangen, und andererseits müssen die Peptide solange intakt bleiben, bis sie wirken können. Gerade dies ist bei ungeschützten Peptiden nahezu ausgeschlossen, da proteolytische Enzyme ubiquitär vorkommen und die eingesetzten Peptide sofort spalten würden.

Es wurden daher mehrere Fragestellungen bearbeitet, wobei die Plexin A2-analogen Peptide im Blickpunkt waren. Erstens weiß man, dass es sich bei den Peptiden um eine Sequenz aus Plexin A2 handelt. Man weiß allerdings nicht, ob diese Stelle bei der Aktivierung des Rezeptors mit Semaphorin 3F oder Neuropilin-2 interagiert. Daher war als erstes die Bindungsfähigkeit der Peptide zu Semaphorin 3F und Neuropilin-2 von Interesse. Außerdem ging es um die Nachweisbarkeit im Serum, um die Peptide *in vivo* zu detektieren.

Zusätzlich wurde eine biotinylierte Variante getestet. Durch die Kopplung an Biotin hat man eventuell die Möglichkeit, das Peptid durch eine Biotin/Streptavidin Bindung sterisch vor proteolytischen Enzymen zu schützen und gleichzeitig die Nachweisbarkeit zu verbessern. Die Frage dabei ist allerdings, ob die Bindungsfähigkeit an den Reaktionspartner und damit die Wirksamkeit durch eine derartige Manipulation erhalten bleibt.

3.6.1 Bindung von AcB13 und AcB14 an Semaphorin 3F und Neuropilin-2

Hier wurde als erstes die Bindung an Semaphorin 3 F bzw. an Neuropilin-2 nachgewiesen. Die Peptide wurden jeweils in einer Konzentrationsreihe von 0,1 bis 50 $\mu\text{mol/l}$ im ELISA verwendet. Man konnte sowohl eine Bindung an Semaphorin 3F als auch an Neuropilin-2 feststellen. (Abbildung 25). Bis vor einiger Zeit dachte man, dass Semaphorin 3F ausschließlich an Neuropilin-2 bindet, das dann wiederum die Signaltransduktion am Plexin A2 auslöst. Neuere Untersuchungen der Bindungsstruktur zeigten allerdings, dass alle drei Komponenten aneinander binden müssen [Hota PK, 2012].

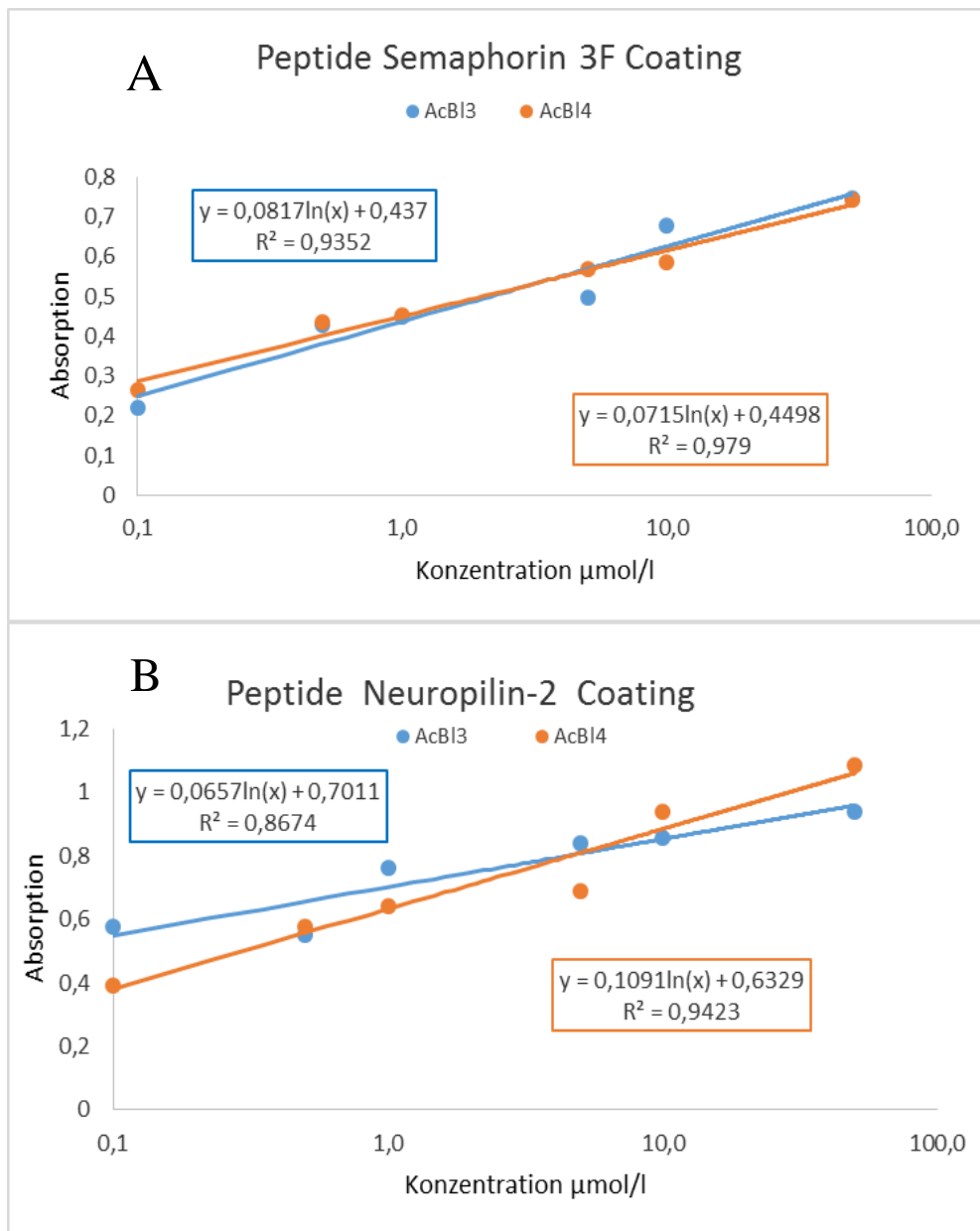


Abbildung 25: ELISA mit AcBI3 und AcBI4 und Semaphorin 3F bzw. Neuropilin-2 Coating

Aufgetragen ist jeweils die Absorption im ELISA gegen die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$. Die Geradengleichung und R^2 sind in den jeweiligen Farben gekennzeichnet.

A: Beide Peptide binden an Neuropilin-2, der quadrierte Korrelationskoeffizient liegt bei 86% (AcBI3) bzw. 94% (AcBI4)

B: Die Bindung an Semaphorin 3F scheint noch ein wenig besser zu sein. Mit einem quadrierten Korrelationskoeffizienten von 93% (AcBI3) bzw. 97% (AcBI4) kann man von einem höchst linearen Zusammenhang ausgehen.

Betrachtet man nun die biotinylierte Variante der Peptide in demselben ELISA, stellte sich heraus, dass sich durch die Biotinylierung die Bindungsfähigkeit an Neuropilin-2 deutlich verschlechtert hat (Abbildung 26). Die Bindung an Semaphorin 3F scheint allerdings davon nicht beeinflusst zu werden.

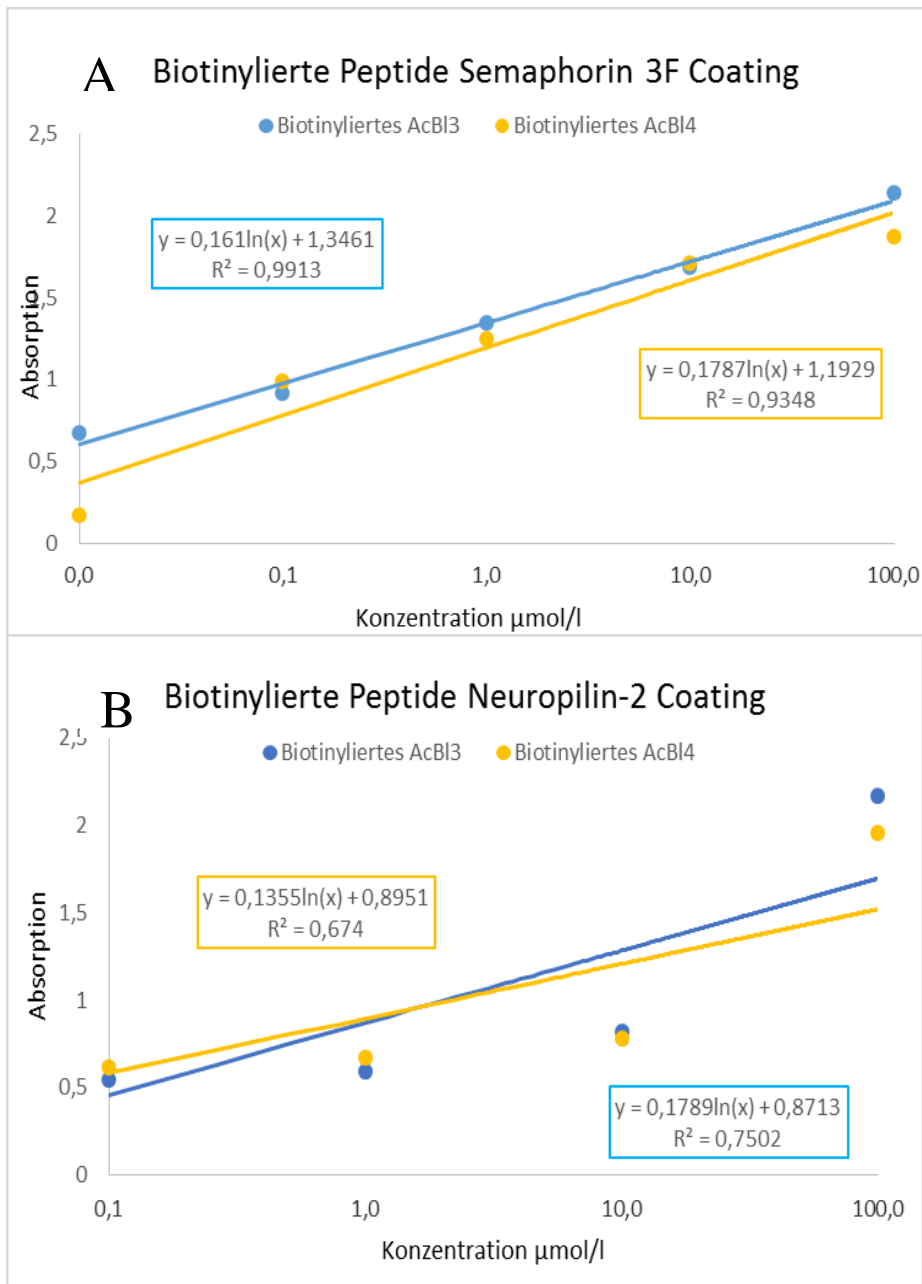


Abbildung 26: Bindung an Semaphorin 3F bzw. Neuropilin-2 der biotinylierten Variante von AcBI3 und AcBI4

Aufgetragen ist jeweils die Absorption gegen die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$. Die Geradengleichung und R^2 sind in den jeweiligen Farben gekennzeichnet.

A: Die Bindung an Neuropilin-2 hat sich deutlich verschlechtert; der quadrierte Korrelationskoeffizient liegt nun bei 75% (AcBI3) bzw. 67% (AcBI4).

B: Die Bindung an Semaphorin 3F hat sich nicht verändert. Mit einem quadrierten Korrelationskoeffizienten von 99% (AcBI3) bzw. 93% (AcBI4) kann man weiterhin von einem hohen linearen Zusammenhang sprechen.

3.6.2 AcBI3 und AcBI4 im Mausserum

Um nun die Möglichkeit zu haben, die Peptide auch im Mausserum nachzuweisen, wurde ein spezieller ELISA mit Peptidcoatingplatten verwendet. Dieser ermöglicht schon den Nachweis geringerer Konzentration und erhöht so die Chance auf einen positiven Nachweis.

Zuerst wurde eine Konzentrationsbestimmung mit in Wasser gelösten Peptiden durchgeführt um die Funktionalität zu überprüfen. Auch in diesem ELISA ist eine zuverlässige Bestimmung der Konzentration der Peptide möglich (Abbildung 27).

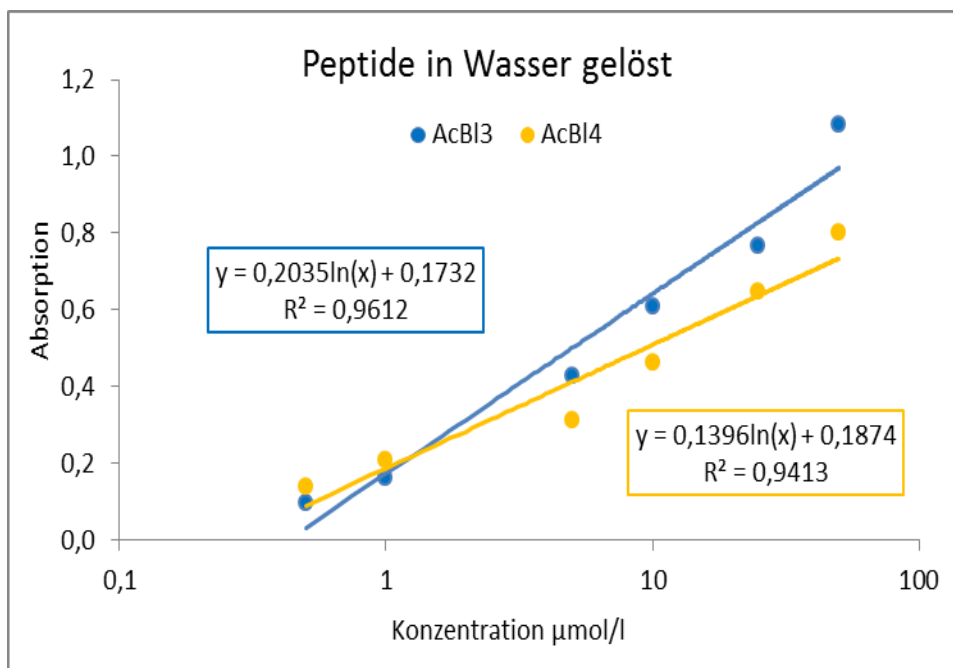


Abbildung 27: Detektion von AcBI₃ und AcBI₄

Aufgetragen ist jeweils die Absorption gegen die Konzentration in µmol/l. Die Geradengleichung und R^2 sind in den jeweiligen Farben gekennzeichnet.

Die Konzentrationen der beiden Peptide lassen sich zuverlässig mit einem quadrierten Korrelationskoeffizienten von 96% (AcBI3) und 94% (AcBI4) bestimmen.

Des Weiteren wurden die Peptide in Mausserum gegeben und die zugegebenen Konzentrationen aus dem Serum bestimmt (Abbildung 28). Hier war die Konzentrationsbestimmung deutlich schwieriger. Daraus kann man schließen, dass mit diesem ELISA der Nachweis der Peptide im Serum kaum möglich ist. Mit AcBI3, das im Serum immerhin einen quadrierten Korrelationskoeffizienten von 77% erreicht hat, wurde noch ein weiterer Versuch unternommen.

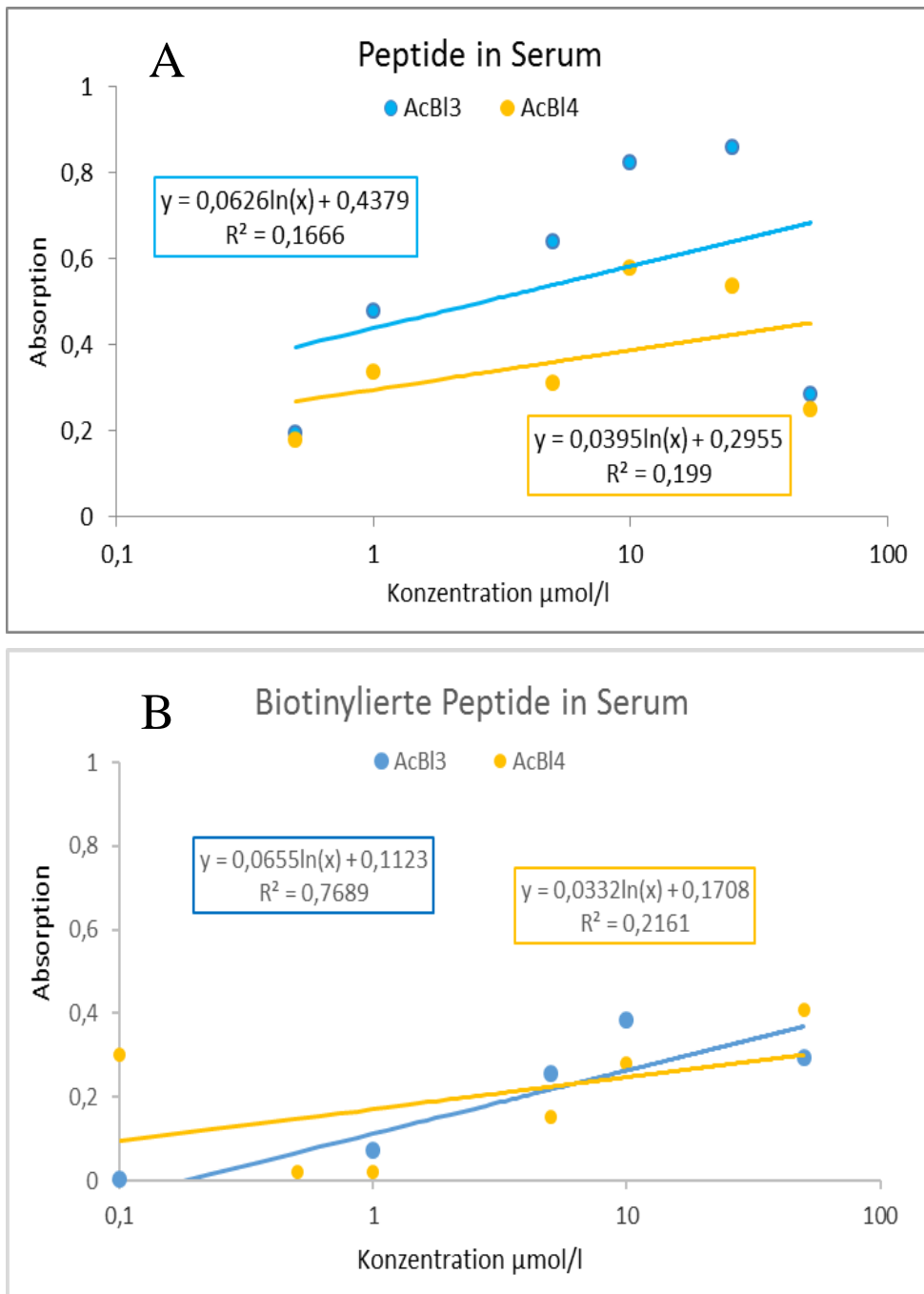


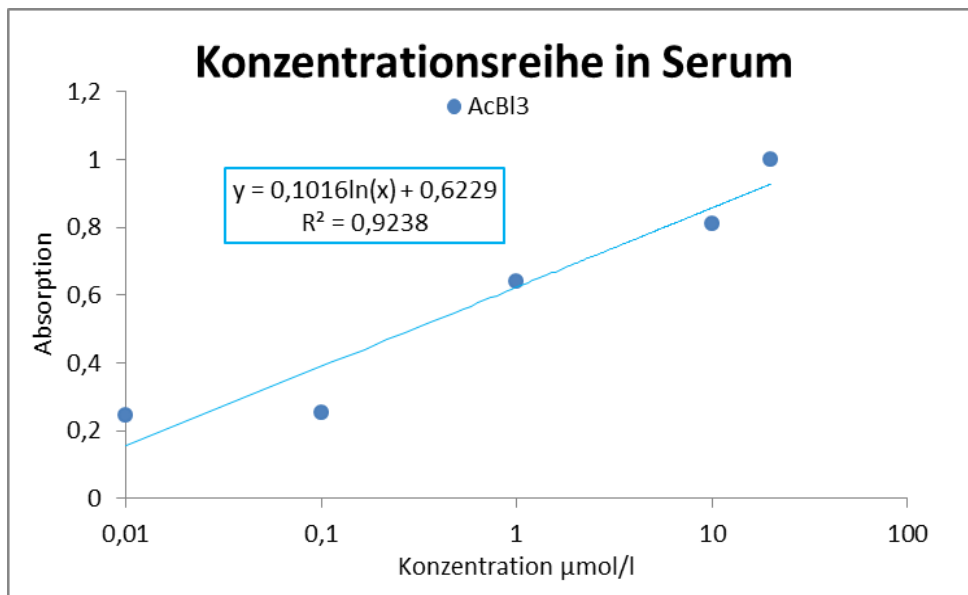
Abbildung 28: Detektion von AcBI₃ und AcBI₄ in Mausserum

Aufgetragen ist jeweils die Absorption gegen die Konzentration in µmol/l. Die Geradengleichung und R^2 sind in den jeweiligen Farben gekennzeichnet.

A: Die Konzentrationen der beiden Peptide lassen sich im Mausserum verdünnt nicht mehr nachweisen.

B: Der Nachweis der biotinylierten Peptide gestaltet sich ebenso schwierig.

Dieses Mal wurden 250 µg des biotinylierten Peptids mit Streptavidin Poly-HRP vorinkubiert und den Mäusen gespritzt. Die 250 µg des Peptides entsprechen geschätzt einer Konzentration von 668 nmol/l im Serum. Das Peptid wurde in PBS gelöst und einer Maus intravenös in die Schwanzvene sowie einer anderen Maus unter Betäubung in die linke Herzkammer injiziert. Fünf Minuten später wurden die Mäuse getötet, und das Blut aus der linken Herzkammer für die Konzentrationsbestimmung aus dem Serum benutzt (Abbildung 29).



AcBI3 in die Maus injiziert

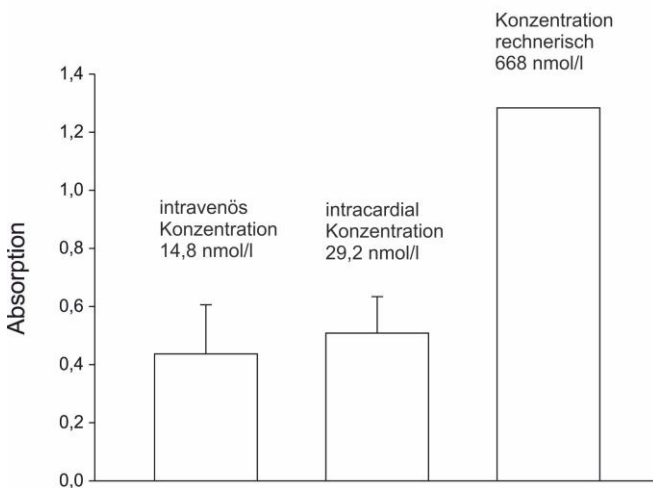


Abbildung 29: Detektion von AcBI₃ nach Injektion in die Maus

Oben: Die Konzentrationsreihe wurde mit den biotinylierten Peptiden, die mit Streptavidin Poly-HRP vorinkubiert wurden, in Mausserum durchgeführt. Aufgetragen wurde die Konzentration in µmol/l.

Unten: Auffinden des AcBI₃-Biotin-Streptavidin-Konstrukts im Serum nach Injektion. Es konnte nur eine geringe Menge des AcBI₃ wiedergefunden werden.

3.7 Einfluss von VEGF 165 auf den Nervenfaserrückzug

Der VEGF-Rezeptor 1 und 2 bildet analog zum Plexin-Rezeptor einen Rezeptorkomplex mit Neuropilin, wobei Neuropilin-1 statt Neuropilin-2 gebunden wird [Jonathan R L Wild, 2012]. Durch diese Ähnlichkeit im Aufbau ist es denkbar, dass es zu wechselseitigen Beeinflussungen der Systeme kommt. Zum Beispiel hat Semaphorin 3A einen Einfluss auf die Angiogenese, indem es den VEGF-R/Neuropilin-1 Rezeptor blockiert [Guttmann-Raviv N, 2007; Szekanecz Z, 2009]. Da VEGF in den entzündeten Gelenken bei RA vermehrt exprimiert wird [Miller LE, 2004], ist ein Einfluss auf den Nervenfaserrückzug denkbar.

Aus diesem Grund wurde VEGF 165 alleine und in Kombination mit Semaphorin 3F im Repulsionsassay auf sympathischen Ganglien eingesetzt.

Wie in Abbildung 29 dargestellt wird, scheinen auch in diesem System die beiden Substanzen Einfluss aufeinander zu nehmen. Durch Zugabe der gleichen Menge VEGF 165 ließ sich der Rückzug der Nervenfasern nahezu vollständig aufhalten.

VEGF 165 im Vergleich mit Semaphorin 3F

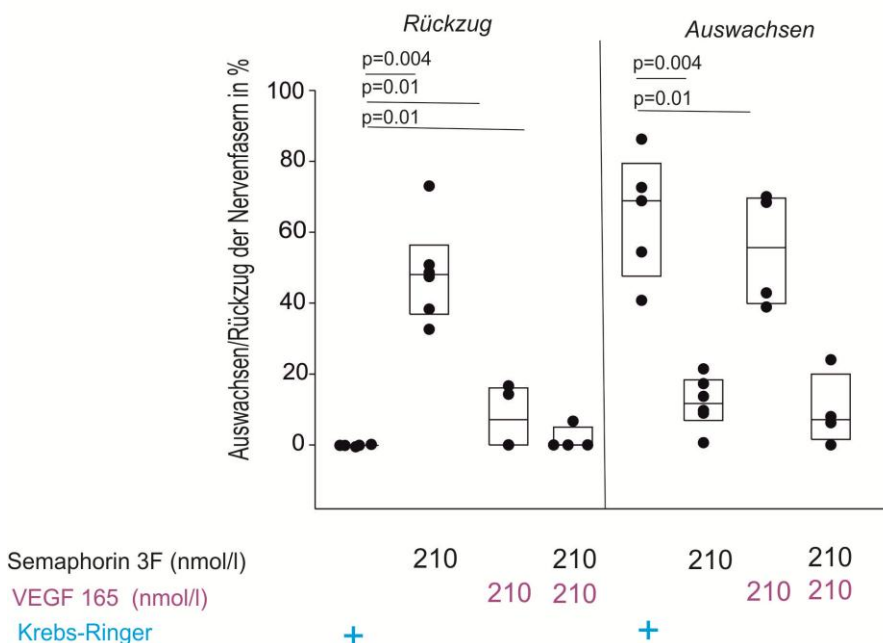


Abbildung 30: VEGF 165 hemmt die Repulsion sympathischer Nervenfasern

In dieser Untersuchung wurde der alleinige Einsatz von Semaphorin 3F und VEGF 165 mit einer Kombination der beiden Substanzen verglichen. Bei Einsatz beider Substanzen findet nahezu keine Repulsion durch Semaphorin 3F statt.

3.8 Humane, induzierte, Tyrosinhydroxylase-positive Zellen

Die bisher vorgestellten Ergebnisse beruhen alle auf Versuchen mit Tieren bzw. tierischen Zellen. Es ist möglich, aus humanem Fettgewebe mesenchymale Stammzellen zu gewinnen und diese zu Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen zu differenzieren. [Trzaska KA, 2011] Daher liegt es nahe, zu untersuchen, ob sich diese Zellen ähnlich wie die bisher untersuchten sympathischen Nervenfasern der Maus verhalten. Tyrosinhydroxylase-positive Zellen sind in der Lage Dopamin und die anderen Katecholamine zu produzieren. Die Differenzierung der Zellen wird mit einer Tyrosinhydroxylase (TH)-Färbung nachgewiesen. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung der Aminosäure Tyrosin in L-DOPA, und dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Synthese der Katecholamine. Und damit besitzen diese Zellen Eigenschaften der sympathischen Neurone.

3.8.1 Nachweis von Plexin A2 und Neuropilin-2 auf humanen, induzierten, Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen

Es wurde zunächst die Frage beantwortet, ob diese Zellen über den Plexin A2/Neuropilin-2 Rezeptor verfügen. Dazu wurde mit den ausdifferenzierten Zellen je eine Immunfluoreszenz-Färbung auf Neuropilin-2 bzw-Plexin A2 durchgeführt. Um die Spezifität der Färbung abzusichern, wurde zunächst mit den Antikörpern gefärbt. In einem zweiten Ansatz wurde der Antikörper blockiert, indem er zuvor mit dem zur Herstellung des Antiköpers verwendeten Protein inkubiert wurde. In diesem Versuch wurden die humanen Varianten der Antikörper und Proteine eingesetzt. Da es sowohl Zellen von Patienten mit Osteoarthritis (OA) als auch von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) gab, wurden diese getrennt untersucht.

Es konnte ein deutlicher Unterschied zwischen RA und OA Patienten feststellen. Man konnte bezüglich der Anti-Neuropilin-2 Färbungen sehr gut die angefärbten Zellen erkennen, und auch Plexin A2 war in den Zellen vorhanden. Da sich die Bindung der Antikörper durch das zugegebene Protein verhindern ließ, ist die Bindung spezifisch (Abbildung 31). Im Gegensatz zu RA ist bei OA die Färbung kaum erkennbar (Abbildung 32).

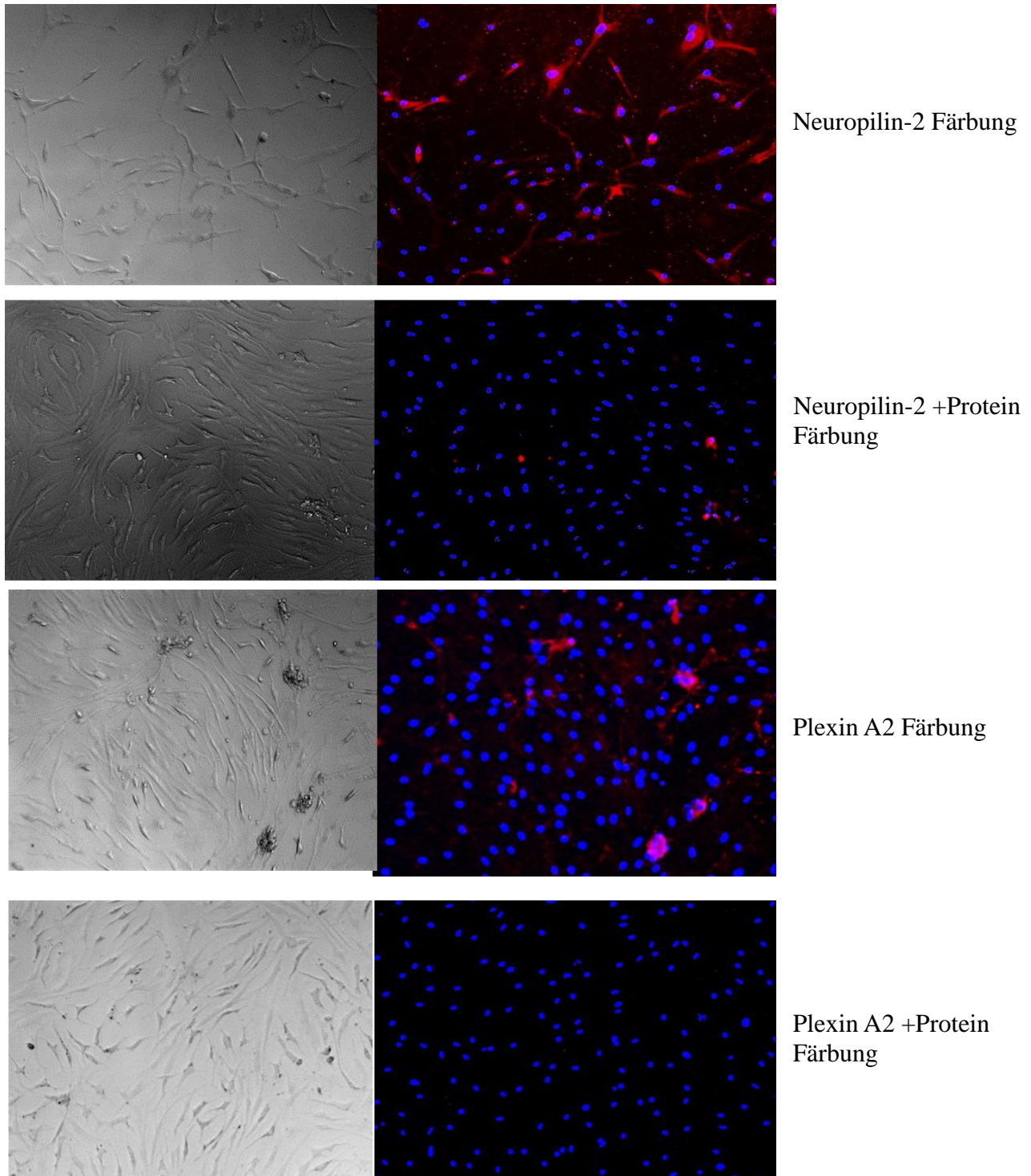


Abbildung 31: Detektion von Neuropilin-2 und Plexin A2 auf dopaminerg differenzierten Zellen bei RA

Rechts in der Abbildung ist die Fluoreszenzfärbung und links derselbe Bildausschnitt im Durchlicht dargestellt. Die oberen Bilder zeigen die Ergebnisse mit dem Antikörper alleine, und die unteren Bilder zeigen Ergebnisse nach Neutralisation der Antikörper.

Es wurde auch eine Isotypkontrolle durchgeführt, die negativ war. Diese ist zur besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

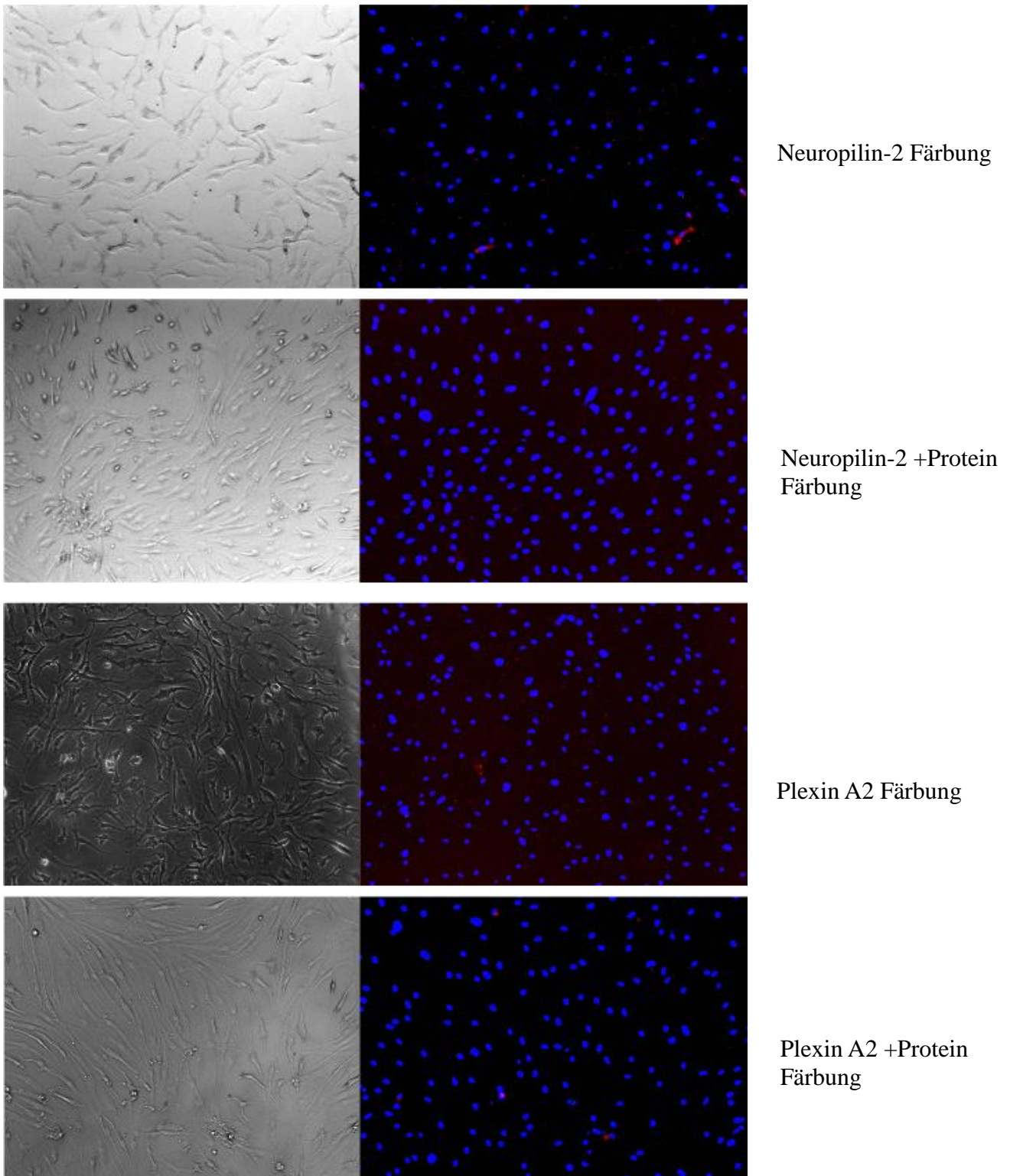


Abbildung 32: Detektion von Neuropilin-2 und Plexin A2 auf dopaminerg differenzierten Zellen bei OA

Rechts in der Abbildung ist die Fluoreszenzfärbung und links derselbe Bildausschnitt im Durchlicht dargestellt. Die oberen Bilder zeigen die Ergebnisse mit dem Antikörper alleine, und die unteren Bilder zeigen Ergebnisse nach Neutralisation der Antikörper.

Es wurde auch eine Isotypkontrolle durchgeführt, die negativ war. Diese ist zur besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

3.8.2 Humane, induzierte, Tyrosinhydroxylase-positiv ausdifferenzierte Zellen im Repulsionsassay

Da Plexin A2 und Neuropilin-2, wenn auch in unterschiedlicher Menge, auf den humanen dopaminergen Zellen vorhanden waren, wurde ein Repulsionsassay mit Semaphorin 3F durchgeführt.

Hier zeigte sich, dass sich die dendritischen Auswüchse der Zellen, ähnlich wie auch die sympathischen Nervenfasern der Mäuse, unter Einfluss von Semaphorin 3F zurückziehen. In dem Fall der dopaminergen Zellen äußert sich das in einem Abrunden der Zellen.

Es wird auch hier ein deutlicher Unterschied zwischen den RA- und den OA- Zellen sichtbar. Die RA-Zellen reagierten sehr gut auf Semaphorin 3F (Abbildung 33 links). Dies passt auch zu den Ergebnissen der Fluoreszenzfärbung. Die OA- Zellen reagieren hingegen kaum auf Semaphorin 3F (Abbildung 33 rechts).

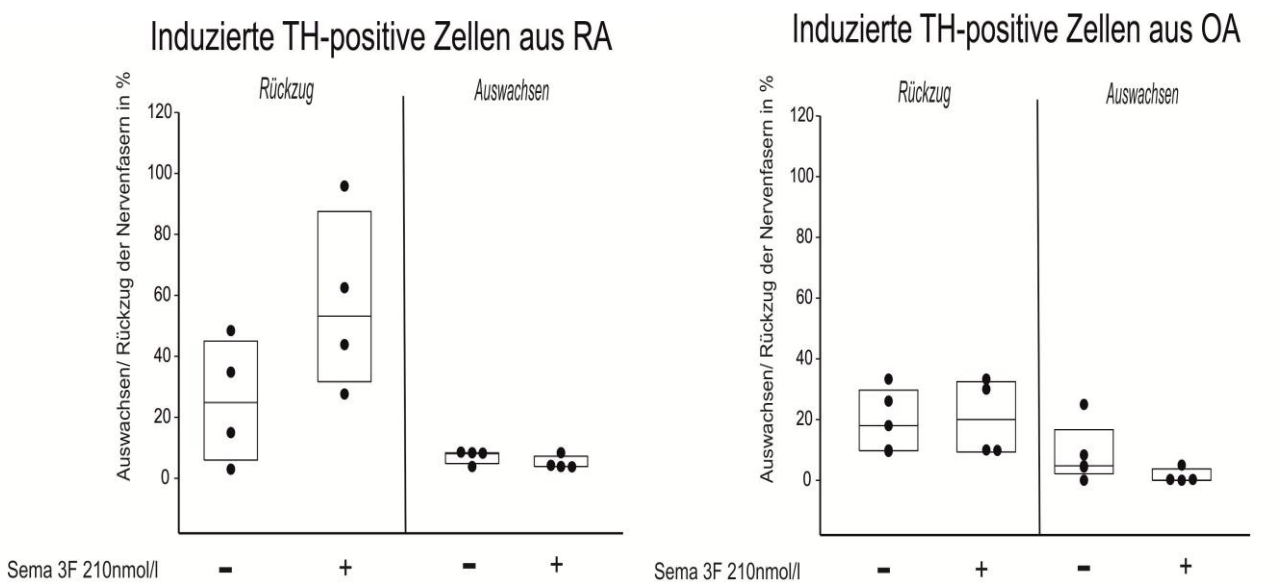


Abbildung 33: Einfluss von Semaphorin 3F auf dopaminerge Zellen aus RA und OA

A: Die Zugabe von 210nmol/l Semaphorin 3F führte zu einem deutlichen Rückzug der Nervenfasern bei RA (ca. 50% im Vergleich zu 23% ohne Semaphorin 3F).

B: Bei OA hatte Semaphorin 3F keinen Einfluss. Der Rückzug blieb unverändert bei ca. 20%.

Ein Punkt steht für einen Versuch im Repulsionsassay. Im Box Plot sind Median sowie 25% und 75% Perzentile angegeben.

Abkürzungen: Sema: Semaphorin

4 Diskussion

4.1 Methoden zum Hemmen der Plexin A2 / Neuropilin-2 Signaltransduktion

4.1.1 *In vitro* Ergebnisse aus dem Repulsionsassay

Im ersten Teil der Arbeit ging es darum, verschiedene Möglichkeiten zu beschreiben, den Plexin A2 / Neuropilin-2 Signalweg zu hemmen. Das ist in vielfältiger Weise geschehen, es wurden insgesamt sechs verschiedene Moleküle identifiziert, die an vier verschiedenen Angriffspunkten den Signalweg unterbrechen können. Dies wurde anhand der gewonnenen Daten aus dem Repulsionsassay gezeigt. Die Substanzen und ihr Eingriffspunkt sind im folgenden Schema zusammengefasst dargestellt (Abbildung 34).

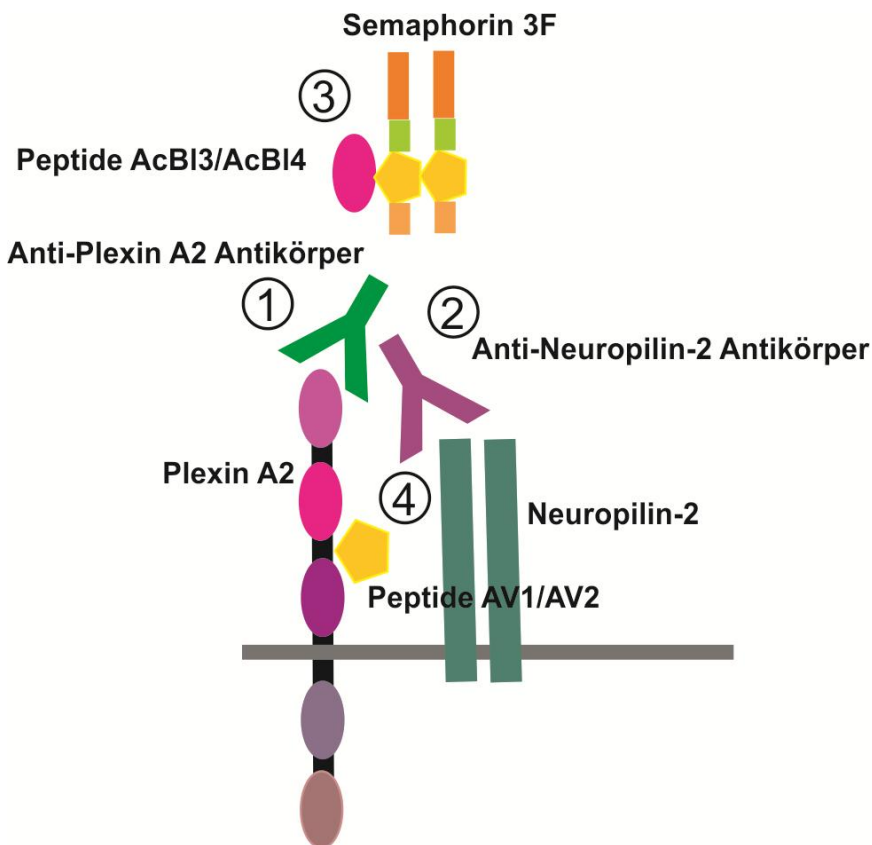


Abbildung 34: Schema der Eingriffsmöglichkeiten am Plexin A2 / Neuropilin-2 Rezeptor

1 und 2: Die Antikörper binden an ihrem jeweiligen Zielmolekül Plexin A2 oder Neuropilin-2 und verhindern so einen Zusammenschluss der Rezeptoren mit ihrem Liganden.

3: AcBI3 und AcBI4 sind Plexin A2- analoge Peptide die, nachgewiesenermaßen, am Semaphorin 3F und auch an das Neuropilin-2 binden und somit den Rezeptor blockieren.

4: AV1 und AV2 sind Semaphorin 3F -analoge Peptide, die durch Bindung an den Rezeptorkomplex ebenfalls eine Blockade bewirken.

Diese neuen Moleküle eröffnen einen Weg, die Signalgebung und damit die Migration von Nervenfasern experimentell zu beeinflussen. Da mittlerweile sowohl die Semaphorine als auch Neuropiline nicht mehr alleine für die Wegfindung der Axone verantwortlich sind, ist es durchaus denkbar die Peptide und Antikörper auch an anderer Stelle einzusetzen.

So hat sich beispielsweise herausgestellt, dass Semaphorin 3F antiangiogenetisch wirksam ist [Guo HF 2013], oder auch tumorsuppressiv bei einigen hormonabhängigen Darmkrebsarten wirkt [Bollard J, 2015; Gao X, 2015].

Neuropilin-2 ist als Corezeptor nicht nur auf Plexine beschränkt, sondern hat eine große Zahl an Liganden. So bindet er neben dem VEGF-Rezeptor auch noch den TGF- β -Rezeptor als Korezeptor und ist somit auch in diese Signalwege involviert. So hat sich für Neuropilin-1 und -2 eine wachstumsfördernde Wirkung auf Tumore gezeigt, die sowohl über die angiogenetische Wirkung als auch direkt vermittelt wird [Ellis LM, 2006; Prud'homme GJ, 2012].

Im Immunsystem werden Neuropiline von dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen exprimiert. Sie haben dort eine eher suppressive Wirkung [Prud'homme GJ, 2012].

Damit ist ein weites Feld an Einsatzmöglichkeiten der Blocksubstanzen auch außerhalb der axonalen Wegfindung und der rheumatoiden Arthritis gegeben.

4.1.2 *In vivo* Ergebnisse aus dem Kollagen-induzierten Arthritis Mausmodell

Ziel war eine klinische Verringerung der rheumatoiden Arthritis Symptome durch Hemmen des Rückzugs der sympathischen Nervenfasern aus dem Entzündungsgebiet zu erreichen. Die Hypothese besagt, dass durch ein Ungleichgewicht zwischen sympathischen und sensorischen Nervenfasern im Laufe der RA eine Milieuerschiebung zugunsten der Entzündungsreaktion stattfindet [Pongratz, 2013]. Dies wird durch die Anwesenheit von Semaphorin 3C und 3F, die selektiv repulsiv auf sympathische Nervenfasern wirken, verstärkt [Koeck FX, 2009]. Zusätzlich ist in der Entzündung ein erhöhtes Vorhandensein von NGF nachgewiesen worden. NGF ist für das Wachstum der sympathischen Nerven essentiell, aber auch wachstumsfördernd für sensorische Nerven. Zusätzlich fördert es die Differenzierung zu nozizeptiven Nerven [Davies AM, 2000].

Um in diesen Verlauf positiv eingreifen zu können, wurde eine Blockade des Plexin A2 /Neuropilin-2 Rezeptors angestrebt. Leider konnte in den durchgeführten Versuchen weder mit dem Anti-Plexin A2 noch mit den Anti-Neuropilin-2 Antikörpern eine Verbesserung der experimentellen Arthritis gezeigt werden.

Dies kann mehrere Gründe haben. Erstens kann Art, Zeitpunkt und Dosis der Applikation falsch gewesen sein. Die applizierte Dosis könnte zu niedrig gewesen sein, bzw. es könnte nicht genügend Wirkstoff im Synovium angekommen sein. Bei der Dosisfindung wurden allerdings gängige Dosierungen für therapeutische Antikörper verwendet [Kanakaraj P, 2012]. Ebenso ist in der Literatur für TNF-Antikörper beschrieben, dass bei intraperitonealer Applikation eine ausreichende Menge des Antikörpers ins Synovium gelangt [Williams RO, 1992]. Zusätzlich wurden in den Versuchen mehrere Alternativen getestet. Neben der intraperitonealen Gabe wurde auch eine intravenöse Injektion versucht. Ebenso wurde neben dem präventiven Versuch an Tag 4 nach Induktion auch eine spätere therapeutische Gabe untersucht. In früheren Studien mit sympathektomierten Mäusen wurde gezeigt, dass der Zeitpunkt der Applikation entscheidend ist. So wirkt der Sympathikus in der frühen Phase entzündungsfördernd und erst in der späteren Phase der Arthritis entzündungshemmend [Härle P, 2005]. Das könnte bedeuten, dass die Behandlung am Tag 4 keinen präventiven Nutzen hat, sondern eher entzündungsfördernd wirkt. Bei der Injektion zu einem späteren Zeitpunkt ist es nicht sicher, ob ein Blockieren des Rückzugs auch gleichzeitig ein Auswachsen der Nervenfasern bedeutet, obwohl dieses Phänomen im Repulsionsassay sichtbar wurde.

Es wäre durchaus denkbar, dass ein modifizierter monoklonaler Antikörper, der deutlich häufiger hätte appliziert werden kann, hier bessere Ergebnisse gebracht hätte. Ebenso wäre es möglich gewesen, dass die Peptide eine Wirkung erzielt hätten. Diese zu verabreichen, war allerdings wegen ihrer Instabilität im Serum nicht möglich.

Zweitens kann aber auch der Mechanismus nicht geeignet sein, eine Veränderung des Entzündungsmilieus zu bewirken.

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, ist der Einfluss des Sympathikus über α -Rezeptoren proinflammatorisch, während der Signalweg über β -Rezeptoren als antiinflammatorisch gilt. Die Signalweiterleitung über die β -Rezeptoren läuft dabei wie folgt ab. Der β -Rezeptor ist in der Regel G α s gekoppelt. Bei einer Aktivierung wird durch Dephosphorylierung mithilfe der Adenylatcyclase das Adenosintriphosphat (ATP) in ein cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umgewandelt. Phosphodiesterasen (PDE) bauen cAMP wieder ab. cAMP aktiviert des Weiteren die Proteinkinase A (PKA) [Lefkowitz RJ, 1998]. Die PKA aktiviert wiederum verschiedene Transkriptionsfaktoren, die entzündungshemmende Effekte auslösen [Raker VK, 2016]. cAMP kann immunsuppressiv wirken, indem es regulatorische T-Zellen induziert [Bopp T, 2007; Raker VK, 2016].

Diese klassische Wirkungsweise kann sich aber verändern. Mittlerweile weiß man, dass die Expression der α - und β -Rezeptoren auf Immunzellen ähnlich wie der intrazelluläre Signalweg dynamisch reguliert ist. So wurde in Makrophagen unter Einfluss der Entzündung eine Verschiebung der Adrenorezeptor-Expression weg von β -Rezeptoren hin zu α -Rezeptoren beobachtet [Roupe van der Voort C, 1999; Lorton D, 2013].

Ebenso ist die Verringerung der Adrenorezeptoren unter stetigem Einfluss der Agonisten im Nervensystem schon seit längerem bekannt. Das geschieht durch die G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase (GRK), die am β -Rezeptor durch Phosphorylierung eine Bindungsstelle für β -Arrestin schafft. Durch das β -Arrestin wird der Rezeptor inaktiviert und anschließend internalisiert und abgebaut [Reiter E, 2006; Lohse MJ, 1990]. Dieser Mechanismus ist mittlerweile auch bei Immunzellen bekannt [Lorton D, 2015].

Ein weiterer Prozess ist die Verschiebung von einer *Gas* zu einer *Gai* Kopplung des Rezeptors. Hierbei wird durch die Phosphorylierung des Rezeptors durch PKA eine erhöhte Kopplung an das *Gai* Protein statt wie vorher an das *Gas* Protein erreicht. Dadurch führt der Signalweg nicht mehr zu einer vermehrten Bildung von cAMP, über Aktivierung der Adenylatcyclase, sondern zu einer Senkung der cAMP Konzentration und zu einer Erhöhung der *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) [Lorton D, 2013; Jenei-Lanzl Z, 2015; Scanzano, 2015; Elenkuv IJ, 2000].

Die beschriebenen Mechanismen am β - Rezeptor werden in der Abbildung 35 noch einmal zusammengefasst.

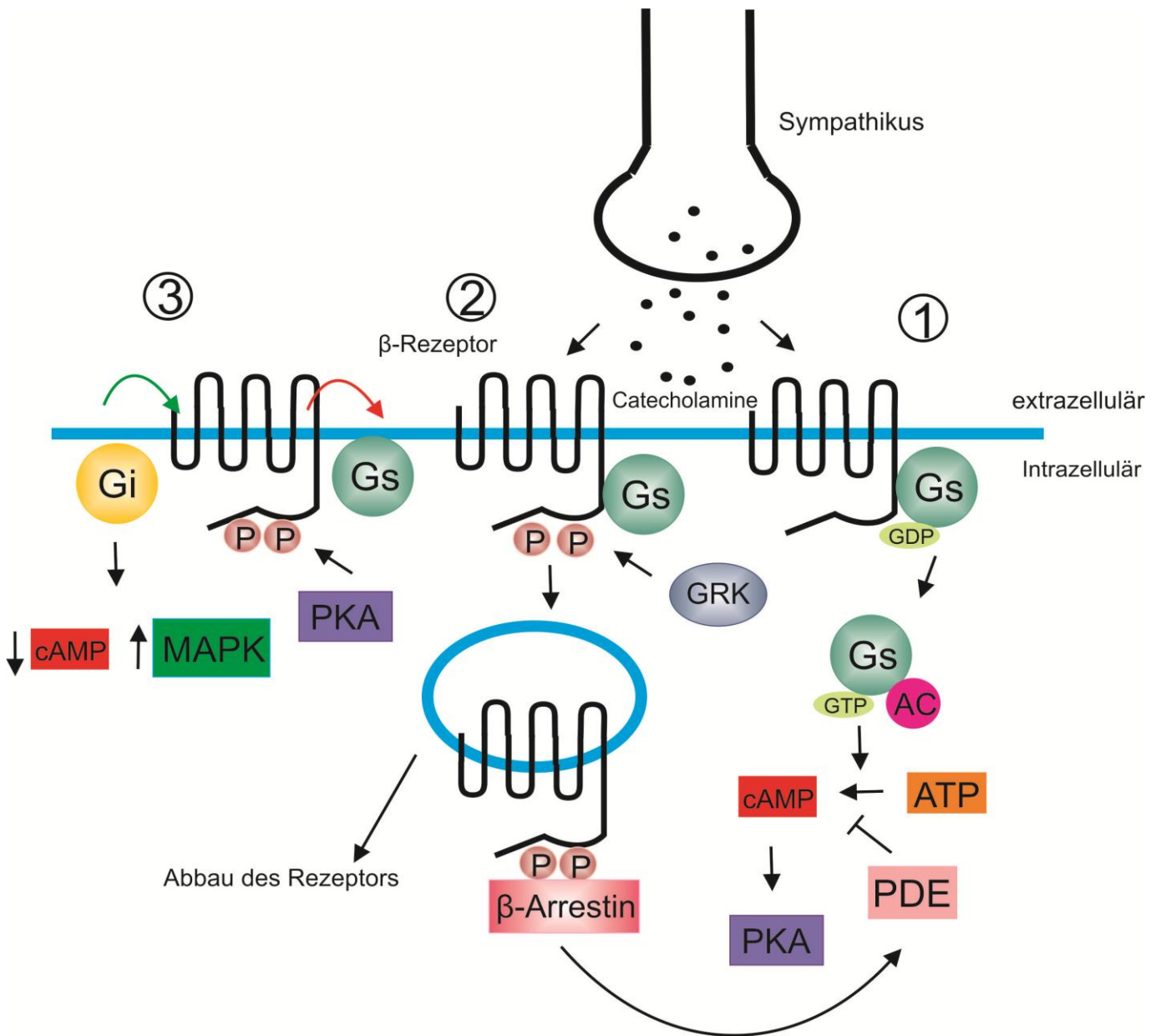


Abbildung 35: Schema der Signaltransduktion am β -Rezeptor

- 1: Der klassische Weg der Signaltransduktion. Der Ligand aktiviert den β -Rezeptor und die G_s Untereinheit moduliert die Aktivität der Adenylatcyclase, die wiederum ATP in cAMP umwandelt. cAMP wirkt direkt oder über die PKA entzündungshemmend. Die Phosphodiesterase (PDE) baut cAMP ab.
- 2: Wird der β -Rezeptor von GRK phosphoryliert, kann β -Arrestin binden. Der Rezeptor wird daraufhin internalisiert und abgebaut. Zusätzlich steigert β -Arrestin die Aktivität der PDE.
- 3: Ebenso kann eine Rezeptor-Phosphorylierung über PKA erfolgen. Dies fördert die Bindung der G_i Untereinheit und vermindert die Bindungsfähigkeit von G_s . Der Signalweg von G_i ist entzündungsfördernd durch Senkung der cAMP und Erhöhung der Mitogen-activated protein kinase (MAPK) [nach Jenei-Lanzl Z, 2015]

Abkürzungen: AC: Adenylatcyclase; ATP: Adenosintri-phosphat; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; GDP: Guanosindiphosphat; GTP: Guanosintri-phosphat; GRK: G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinase; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; PDE: Phosphodiesterase; PKA: Proteinkinase A

Eine dritte Möglichkeit, die zu einer Unwirksamkeit der applizierten Antikörper beitrug, besteht, in dem neuerlichen Auswachsen der Ganglien. Durch die hohen NGF Konzentrationen im Entzündungsgebiet sollte ein Wachstum der sympathischen Nervenfasern angeregt werden. Es könnten allerdings Faktoren vorhanden sein, die das Wachstum der Nervenfasern verhindern. So ist zum Beispiel TNF dafür bekannt, im zentralen Nervensystem bei neuronalen Entzündung zu einem Verlust von Synapsen zu führen. Das geschieht unter anderem durch eine Verminderung des F-Actin bindenden Proteins Drebin, wodurch es zu einer Destabilisierung des Zytoskelettes kommt. [Poon VY, 2012; Mc Guire C, 2011; Santello M, 2012; Jagadeesh SR, 2012]. Als Zytoskelett wird ein Netzwerk aus Proteinen bezeichnet, das sich im Zytoplasma eukaryotischer Zellen befindet. Hauptbestandteile sind Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli.

Da dieser TNF-bedingte Einfluss auf das Zytoskelett dem der Semaphorine nicht unähnlich ist, ist es durchaus vorstellbar, dass auch beim peripheren Nervensystem hohe TNF-Konzentrationen zu einem Rückzug der Nervenfasern führen.

Als vierter Punkt sei der Einfluss von VEGF auf das System genannt. Es wurde in den Ergebnissen gezeigt, dass die Zugabe von VEGF 165 die Wirkung des Semaphorin 3F nahezu aufheben kann. In entzündeten Gelenken der RA ist eine sehr hohe VEGF Konzentration vorhanden [Taylor P, 2000; Paleolog EM, 2002]. Es kann daher sein, dass eine Blockade des Plexin A2/ Neuropilin-2 Rezeptors durch VEGF vorliegt und somit die Blocksubstanzen ohne Wirkung sind.

Semaphorine und Plexine spielen auch eine immer größer werdende Rolle in der Modifikation des Immunsystems. Besonders Semaphorine der Klassen 4,6 und 7 sowie die Plexine A und B werden von verschiedenen Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems exprimiert [Roney K, 2013]. Beispielsweise hat das Zusammenspiel von Semaphorin 3A und Plexin A4 eine Verminderung der T-Zell-Proliferation und -Differenzierung sowie eine geringere Migration von DCs und Monozyten zur Folge [Lepelletier Y, 2006; Yamamoto M, 2008; Wen H, 2010]. Es wäre daher denkbar, dass die Blockade von Semaphorin 3F und Plexin A2 entzündungsfördernde Effekte ausübt.

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass das ganze System der Semaphorine, Plexine und Neuropiline sehr komplex ist. Es ist daher zweifelhaft, ob hier eine Verbesserung der Entzündung erreicht werden kann.

4.2 Die transgene Neuropilin-2/eGFP Maus

Ziel war es, eine Maus zu züchten, deren Neuropilin-2 Rezeptoren mit eGFP markiert sind und daher grün fluoreszieren. Die ersten zwei Zuchtschritte, das Verpaaren mit Wildtyp-Mäusen zum Entfernen der Flp-Sequenz und das anschließende Rückkreuzen, waren erfolgreich.

Die so erhaltenen heterozygoten und später auch homozygoten Tiere wurden jeweils mit den zwei Cre-Mausstämmen CMV-CRE und EIIa-CRE verpaart. Anhand der PCR gab es Nachkommen, die bezüglich der Sequenz heterozygot waren. Leider ließ sich bei diesen Tieren aber keine Fluoreszenz feststellen. Auch eine Immunfluoreszenzfärbung auf eGFP in den sympathischen Nervenfasern brachte keinen Nachweis leuchtender Neurone.

Daraufhin wurden die beiden Cre-Stämme mit einer sogenannten ROSA-YFP Reportermaus verpaart. Das ist eine gängige Methode, eine Cre-Maus zu prüfen [Abram CL, 2014]. Die ROSA-YFP ist ein Mausstamm mit geflochten Fluoreszenzgenen, um die Effektivität der Cre-Mäuse zu überprüfen. Dieser Ansatz schlug fehl. Im nächsten Schritt müsste man herauszufinden, ob es eine weitere CRE-Maus gibt, die in diesem Modell zuverlässig die loxP Sequenzen schneidet. Da solche Zuchtschritte sehr langwierig sind, konnten weitere experimentelle Schritte während dieser Promotionsarbeit nicht mehr durchgeführt werden.

4.3 Plexin A2/ Neuropilin-2 Rezeptor auf humanen, Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen

Bisher waren die Versuche zur Repulsion von Nervenfasern auf das Tiermodell beschränkt. Durch die Methode der Ausdifferenzierung von humanen, adipösen, mesenchymalen Stammzellen zu Tyrosinhydroxylase-positiven sympathischen Nervenzellen [Jenei-Lanzl, 2015; Trzaska KA, 2011] stand nun auch erstmals ein menschliches Modell für die axonale Wegfindung zu Verfügung. Der Repulsionsassay konnte daher auf die humanen Zellen übertragen werden.

Das ist deshalb interessant, weil es im entzündeten Gelenk Zellen gibt, die den Mangel an sympathischen Neurotransmittern dadurch ausgleichen, indem sie selbst Katecholamine produzieren [Capellino S, 2012]. Diese TH-positiven, Katecholamin-produzierenden Zellen haben einen modulierenden Einfluss auf die Entzündung. Obwohl auch proinflammatorische Effekte von Katecholamin-produzierenden Phagozyten beschrieben wurden [Flierl MA, 2007], wirken TH-positive Zellen in der experimentellen Arthritis antiinflammatorisch [Capellino S, 2010; Jenei-Lanzl Z, 2015].

Dies könnte ein Schritt zu einer neuen zellbasierten Therapie sein [Jenei-Lanzl Z, 2015]. Die Reaktion dieser Zellen auf neuronale Repulsionsfaktoren und die Hemmung derselben, durch zum Beispiel TNF, kann daher von Interesse sein.

Besonders hervorzuheben ist der Unterschied zwischen den Zellen von Patienten mit OA im Vergleich zu denen mit RA. Es scheint so, als würden Zellen aus RA mehr Neuropilin-2 und Plexin A2 auf der Oberfläche besitzen und auch sensibler auf Semaphorin 3F reagieren. Dies muss aber noch durch weitere Versuche bestätigt werden.

5 Zusammenfassung

Im Verlauf der rheumatoiden Arthritis kommt es zu einem Rückzug sympathischer Nervenfasern aus dem Entzündungsgebiet. Dieser Rückzug wird über die Semaphorine 3F und 3C vermittelt, die unter anderem durch Makrophagen und Fibroblasten ausgeschüttet werden. Die Semaphorine sind Liganden am Plexin A2 / Neuropilin-2 Korezeptor, über den das Zurückziehen der Nervenfasern vermittelt wird. Das Fehlen des Sympathikus im entzündeten Gelenk führt wiederum zu einem Ungleichgewicht der proinflammatorischen und antiinflammatorischen Faktoren in Richtung der Entzündungsförderung. Daher, so die Hypothese, könnte es durch ein Blocken der Sympathikusrepulsion zu einer Verbesserung der Entzündung und damit zu einem günstigeren Verlauf der Erkrankung kommen.

Es wurden sechs verschiedene Moleküle gefunden, die *in vitro* einen hemmenden Effekt zeigten. Zwei Antikörper und vier Peptide wurden im Phage display gefunden. Sie setzten am Semaphorin 3F, am Plexin A2 und am Neuropilin-2 an. Ihnen gemeinsam ist, dass sie alle die durch Semaphorin 3F ausgelöste Repulsion sympathischer Nervenfasern verhindern konnten. Auch VEGF 165 konnte *in vitro* die Repulsion durch Semaphorin 3F aufhalten.

Die *in vivo* im CIA-Mausmodell eingesetzten Antikörper konnten allerdings keine Verbesserung der klinischen Arthritis Symptome, trotz verschiedener Konzentrationen, Applikationsarten und Zeitpunkten der Therapie bewirken. Die gefundenen Peptide wurden nicht im Tierversuch eingesetzt, da sie schon in Vorversuchen im Blut nicht zu detektieren waren.

Der Repulsionsassay, der an sympathischen Mausganglien etabliert war, konnte auf humane, Tyrosinhydroxylase-positive Zellen übertragen werden. Es wurde ein deutlicher Unterschied in der Reaktion auf Semaphorin 3F zwischen Zellen aus RA und OA Patienten festgestellt.

Dies Arbeit hat gezeigt, dass es auf verschiedene Weise möglich ist, den Plexin A2 / Neuropilin-2 Rezeptor zu blockieren und einen Nervenfaserrückzug zu verhindern. Die erwartete Auswirkung auf den Krankheitsverlauf der Arthritis konnte leider nicht gezeigt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abram CL, Roberge GL, Hu Y, Lowell CA. Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. *J Immunol Methods*. 2014; 408:89-100.
- Aizawa H, Kishi Y, Iida K, Sameshima M, Yahara I. Cofilin-2, a novel type of cofilin, is expressed specifically at aggregation stage of Dictyostelium discoideum development. *Genes Cells*. 2001; 6:913-21.
- Avci AB, Feist E, Burmester GR; Biologicals in rheumatoid arthritis: current and future. *RMD Open*. 2015;1:e000127.
- Baker KA, Moore SW, Jarjour AA, Kennedy TE. When a diffusible axon guidance cue stops diffusing: roles for netrins in adhesion and morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol*. 2006:529-34.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139:267-84.
- Bashaw GJ, Klein R. Signaling from axon guidance receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 a001941.
- Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev*. 1996;17:64-102.
- Birklein F, Schmelz M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neurosci Lett*. 2008;437:199-202.
- Blackburn MR, Vance CO, Morschl E, Wilson CN. Adenosine receptors and inflammation. *Handb Exp Pharmacol*. 2009:215-69.
- Bollard J, Massoma P, Vercherat C, Blanc M, Lepinasse F, Gadot N, Couderc C, Poncet G, Walter T, Joly MO, Hervieu V, Scoazec JY, Roche C. The axon guidance molecule semaphorin 3F is a negative regulator of tumor progression and proliferation in ileal neuroendocrine tumors. *Oncotarget*. 2015;6:36731-45.
- Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Heßling S, Palmethofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen, Helmut Jonuleit M, Schmitt E. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*. 2007; 204: 1303–1310.
- Capellino S, Cosentino M, Wolff C, Schmidt M, Grifka J, Straub RH. Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1853-60.
- Carty SM, Snowden N, Silman A.J. Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis? *J Rheumatol*. 2003;30:425-9.

- Casazza A, Fazzari P, Tamagnone L. Semaphorin signals in cell adhesion and cell migration: functional role and molecular mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* 2007;600:90-108.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 1994;263:802-5.
- Chao M V Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4, 299–309.
- Coate TM, Spita NA, Zhang KD, Isgrig KT, Kelley MW. Neuropilin-2/Semaphorin-3F-mediated repulsion promotes inner hair cell innervation by spiral ganglion neurons. *Elife.* 2015;4.
- Davies AM. Neurotrophins: more to NGF than just survival. *Curr Biol.* 2000;10:R374-6.
- de Vries RR, Huizinga TW, Toes RE. Redefining the HLA and RA association: to be or not to be anti-CCP positive. *J Autoimmun.* 2005;25 Suppl:21-5.
- Del Rey A, Wolff C, Wildmann J, Randolph A, Straub RH, Besedovsky HO. When immune-neuro-endocrine interactions are disrupted: experimentally induced arthritis as an example. *Neuroimmunomodulation.* 2010;17:165-8.
- Dickson BJ. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science.* 2002;298:1959-64.
- Drummond PD. The effect of sympathetic activity on thermal hyperalgesia in capsaicin-treated skin during body cooling and warming. *Eur J Pain.* 2001;5:59-67.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 2000; 52:595-638.
- Ellis LM. The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:1099-107.
- Estes BT, Diekman BO, Gimble JM, Guilak F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc.* 2010;5:1294-311.
- Fassold A, Falk W, Anders S, Hirsch T, Mirsky VM, Straub RH. Soluble neuropilin-2, a nerve repellent receptor, is increased in rheumatoid arthritis synovium and aggravates sympathetic fiber repulsion and arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60:2892-901.
- Fassold A, Straub RH. A new assay for nerve fiber repulsion. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1193:43-7.
- Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003;423:356-61.
- Fukasawa M, Matsushita A, Korc M. Neuropilin-1 interacts with integrin beta1 and modulates pancreatic cancer cell growth, survival and invasion. *Cancer Biol Ther.* 2007 44:1173-80.
- Gammill LS, Gonzalez C, Gu C, Bronner-Fraser M. Guidance of trunk neural crest migration requires neuropilin 2/semaphorin 3F signaling. *Development.* 2006;133:99-106.

- Gao X, Tang C, Shi W, Feng S, Qin W, Jiang T, Sun Y. Semaphorin-3F functions as a tumor suppressor in colorectal cancer due to regulation by DNA methylation. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:12766-74.
- Ghilardi JR, Freeman KT, Jimenez-Andrade JM, Coughlin KA, Kaczmarek MJ, Castaneda-Corral G, Bloom AP, Kuskowski MA, Mantyh PW. Neuroplasticity of sensory and sympathetic nerve fibers in a mouse model of a painful arthritic joint. *Arthritis Rheum.* 2012;64:2223-32.
- Glebova NO, Ginty D. Heterogeneous requirement of NGF for sympathetic target innervation in vivo. *J Neurosci.* 2004; 24:743-751.
- Goldstein RS, Bruchfeld A, Yang L, Qureshi AR, Gallowitsch-Puerta M, Patel NB, Huston BJ, Chavan S, Rosas-Ballina M, Gregersen PK, Czura CJ, Sloan RP, Sama AE, Tracey KJ. Cholinergic anti-inflammatory pathway activity and High Mobility Group Box-1 (HMGB1) serum levels in patients with rheumatoid arthritis. *Mol Med.* 2007;13:210-5.
- Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Hajeer AH. Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2002;31:355-60.
- Goodson NJ, Farragher TM, Symmons DP. Rheumatoid factor, smoking, and disease severity: associations with mortality in rheumatoid arthritis *J Rheumatol.* 2008;35:945-9.
- Gross WL, Moosig F, Lamprecht P. Anticitrullinated protein/peptide antibodies in rheumatoid arthritis *Dtsch Arztebl Int.* 2009;106:157-8.
- Guo HF, Li X, Parker MW, Waltenberger J, Becker PM, Vander Kooi C. Mechanistic basis for the potent anti-angiogenic activity of semaphorin 3F. *Biochemistry.* 2013 29;52:7551-8.
- Guttmann-Raviv N, Kessler O, Shraga-Heled N, Lange T, Herzog Y, Neufeld G. The neuropilins and their role in tumorigenesis and tumor progression. *Cancer Lett.* 2006;231:1-11.
- Guttmann-Raviv N, Shraga-Heled N, Varshavsky A, Guimaraes-Sternberg C, Kessler O, Neufeld G. Semaphorin-3A and semaphorin-3F work together to repel endothelial cells and to inhibit their survival by induction of apoptosis. *J Biol Chem.* 2007;282:26294-305.
- Härle P, Möbius D, Carr DJ, Schölmerich J, Straub RH. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005;52:1305-13.
- Herrmann M, Schölmerich J, Straub RH. Stress and rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am.* 2000;26:737-63.
- Hota PK, Buck M. Plexin structures are coming: opportunities for multilevel investigations of semaphorin guidance receptors, their cell signaling mechanisms, and functions. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:3765-805.

- Howarth D, Burstal R, Hayes C, Lan L, Lantry G. Autonomic regulation of lymphatic flow in the lower extremity demonstrated on lymphoscintigraphy in patients with reflex sympathetic dystrophy. *Clin Nucl Med.* 1999;24:383-7.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677-736.
- Hung RJ, Pak CW, Terman JR. Direct redox regulation of F-actin assembly and disassembly by Mical. *Science.* 2011;334:1710-3.
- Hung RJ, Terman JR. Extracellular inhibitors, repellents, and semaphorin/plexin/MICAL-mediated actin filament disassembly. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2011;68:415-33.
- Hung RJ, Yazdani U, Yoon J, Wu H, Yang T, Gupta N, Huang Z, van Berkel WJ, Terman JR. Mical links semaphorins to F-actin disassembly. *Nature.* 2010 11;463:823-7.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 1996; 88, 347–354.
- Jagadeesh SR, Kellom M, Hyung-Wook K, Stanley I. Rapoport Neuroinflammation and synaptic loss. *Neurochem Res.* 2012; 37: 903–910.
- Janssen BJ, Malinauskas T, Weir GA, Cader MZ, Siebold C, Jones EY. Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19:1293-9.
- Janssen BJ, Robinson RA, Pérez-Brangulí F, Bell CH, Mitchell KJ, Siebold C, Jones EY. Structural basis of semaphorin-plexin signalling. *Nature.* 2010;467:1118-22.
- Jenei-Lanzl Z, Capellino S, Kees F, Fleck M, Lowin T, Straub RH. Anti-inflammatory effects of cell-based therapy with tyrosine hydroxylase-positive catecholaminergic cells in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2015;74:444-51.
- Jenei-Lanzl Z, Zwingenberg J, Lowin T, Anders S, Straub RH. Proinflammatory receptor switch from Gas to Gai signaling by β -arrestin-mediated PDE4 recruitment in mixed RA synovial cells. *Brain Behav Immun.* 2015;50:266-74.
- Jonathan R, Wild L, Staton CA, Chapple K, Corfe BM. Neuropilins: expression and roles in the epithelium. *Int J Exp Pathol.* 2012; 93: 81–103.
- Jongbloets BC, Pasterkamp RJ. Semaphorin signalling during development. *Development.* 2014;141:3292-7.
- Kanakaraj P, Puffer BA, Yao XT, Kankanala S, Boyd E, Shah RR, Wang G, Patel D, Krishnamurthy R, Kaithamana S, Smith RG, LaFleur DW, Barbas CF 3rd, Hilbert DM, Kiener PA, Roschke VV. Simultaneous targeting of TNF and Ang2 with a novel bispecific antibody enhances efficacy in an in vivo model of arthritis. *MAbs.* 2012;4:600-13.
- Karouzakis E, Neidhart M, Gay RE, Gay S. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol Lett.* 2006 15;106:8-13.

- Kerstein PC, Nichol RH 4th, Gomez TM. Mechanochemical regulation of growth cone motility. *Front Cell Neurosci.* 2015 7;9:244.
- Klein R, Kania A. Ephrin signalling in the developing nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 2014;27:16-24.
- Koeck FX, Bobrik V, Fassold A, Grifka J, Kessler S, Straub RH. Marked loss of sympathetic nerve fibers in chronic Charcot foot of diabetic origin compared to ankle joint osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2009;27:736-41.
- Kolodkin AL, Tessier-Lavigne M. Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 1;3.
- Koppel AM, Raper JA. Collapsin-1 covalently dimerizes, and dimerization is necessary for collapsing activity. *J Biol Chem.* 1998 Jun 19;273(25):15708-13.
- Lai Wing Sun K, Correia JP, Kennedy TE. Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development.* 2011;138:2153-69.
- Lakso M, Pichel JG, Gorman JR, Sauer B, Okamoto Y, Lee E, Alt FW, Westphal H. Efficient *in vivo* manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;5860-5.
- Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem.* 1998 24;273:18677-80.
- Lepelletier Y, Moura IC, Hadj-Slimane R, Renand A, Fiorentino S, Baude C, Shirvan A, Barzilai A, Hermine O. Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization. *Eur J Immunol.* 2006;36:1782-93.
- Levine JD, Collier DH, Basbaum AI, Moskowitz MA, Helms CA. Hypothesis: the nervous system may contribute to the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1985;12:406-11.
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science.* 1990 22;248:1547-50.
- Lorton D, Bellinger DL, Schaller JA, Shewmaker E, Osredkar T, Lubahn C. Altered sympathetic-to-immune cell signaling via β_2 -adrenergic receptors in adjuvant arthritis. *Clin Dev Immunol.* 2013:764395.
- Lorton D, Bellinger DL. Molecular mechanisms underlying β -adrenergic receptor-mediated cross-talk between sympathetic neurons and immune cells. *Int J Mol Sci.* 2015;16:5635-65.
- Masuda T, Shiga T. Chemorepulsion and cell adhesion molecules in patterning initial trajectories of sensory axons. *Neurosci Res.* 2005;51:337-47.
- Mc Guire C, Beyaert R, van Loo G. Death receptor signalling in central nervous system inflammation and demyelination. *Trends Neurosci.* 2011;34:619-28.

- McInnes IB, O'Dell JR. State-of-the-art: rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1898-906.
- McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011 8;365:2205-19.
- Miller FD, Kaplan DR. On Trk for retrograde signaling. *Neuron*. 2001; 32:767-770.
- Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J*. 2000;14:2097-107.
- Miller LE, Weidler C, Falk W, Angele P, Schaumburger J, Schölmerich J, Straub RH. Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50:1156-63.
- Moore SW, Tessier-Lavigne M, Kennedy TE. Netrins and their receptors. *Adv Exp Med Biol*. 2007;621:17-31.
- Morand EF, Leech M. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation of inflammation in rheumatoid arthritis. *Immunol Cell Biol*. 2001;79:395-9.
- Müller-Ladner U, Gay S. Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis. In: Straub RH (Hrsg.) *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen Band 2* Vandenhoeck & Ruprecht; 2007,70-79.
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Schäfer-Korting M; *Arzneimittlewirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wiss. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2008,260-274.
- Mutschler E, Schaible HG, Vaupel P. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wiss. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2007,680ff.
- Nadella M, Bianchet MA, Gabelli SB, Barrila J, Amzel LM. Structure and activity of the axon guidance protein MICAL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:16830-5.
- Nance DM, Sanders VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun*. 2007;21:736-45.
- Nasarre P, Gemmill RM, Drabkin HA. The emerging role of class-3 semaphorins and their neuropilin receptors in oncology. *Onco Targets Ther*. 2014 24;7:1663-87.
- Neumann E, Gay RE, Gay S, Müller-Ladner U. Functional genomics of fibroblasts. *Curr Opin Rheumatol*. 2004;16:238-45.
- Paleolog EM. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2002; 4(Suppl 3): S81–S90.
- Pasterkamp RJ, Giger RJ. Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2009;19:263-74.
- Pasterkamp RJ, Verhaagen J. Semaphorins in axon regeneration: developmental guidance molecules gone wrong? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006;361:1499-511.

- Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med.* 2003;9:125-34.
- Pincus T. Guidelines for monitoring of methotrexate therapy: "evidence-based medicine" outside of clinical trials. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2706-9.
- Pongratz G, Straub RH. Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9:117-26.
- Pongratz G, Straub RH. The sympathetic nervous response in inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:504.4.
- Poon VY, Choi S, Park M. Growth factors in synaptic function. *Front Synaptic Neurosci.* 2013;18:5.6.
- Pratt AG, Isaacs JD. Genotyping in rheumatoid arthritis: a game changer in clinical management? *Expert Rev Clin Immunol.* 2015;11:303-5.
- Prud'homme GJ, Glinka Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget.* 2012;3:921-39.
- Püschel AW. GTPases in semaphorin signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2007;600:12-23.
- Raker VK, Becker C, Steinbrink K. The cAMP Pathway as Therapeutic Target in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2016; 7: 123.
- Raper J, Mason C. Cellular strategies of axonal pathfinding. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a001933.
- Regenass-Klotz M. Grundzüge der Gentechnik: Theorie und Praxis. Springer Basel AG 1998;92 ff.
- Reiter E, Lefkowitz RJ. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17:159-65.
- Rodger J, Salvatore L, Migani P. Should I stay or should I go? Ephs and ephrins in neuronal migration. *Neurosignals.* 2012;20:190-201.
- Roney K, Holl E, Ting J. Immune plexins and semaphorins: old proteins, new immune function. *Protein Cell.* 2013; 4: 17–26.
- Roupe van der Voort C, Kavelaars A, van de Pol M, Heijnen CJ. Neuroendocrine mediators up-regulate alpha1b- and alpha1d-adrenergic receptor subtypes in human monocytes. *J Neuroimmunol.* 1999;95:165-73.
- Sánchez-Camacho C, Bovolenta P. Emerging mechanisms in morphogen-mediated axon guidance. *Bioessays.* 2009;31:1013-25.
- Sánchez-Camacho C, Rodríguez J, Ruiz JM, Trousse F, Bovolenta P. Morphogens as growth cone signalling molecules. *Brain Res.* 2005;49:242-52.

- Sanders VM, Straub RH. Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity. *Brain Behav Immun.* 2002;16:290-332.
- Sanders VM. The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: do we understand it yet? *Brain Behav Immun.* 2012;26:195-200.
- Santello M1, Volterra A. TNF α in synaptic function: switching gears. *Trends Neurosci.* 2012;35:638-47.
- Scanzano A, Cosentino M. Adrenergic regulation of innate immunity: a review. *Front Pharmacol.* 2015;6:171.
- Schmidt EF, Shim SO, Strittmatter SM. Release of MICAL autoinhibition by semaphorin-plexin signaling promotes interaction with collapsin response mediator protein. *J Neurosci.* 2008;28:2287-97.
- Schwenk F; Baron U; Rajewsky K. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:5080-1.
- Shen K, Cowan CW. Guidance molecules in synapse formation and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a001842.
- Sitkovsky MV. Use of the A(2A) adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo. *Biochem Pharmacol.* 2003;65:493-501.
- Smith RD. Effect of hemiparesis on rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1979;22:1419-20.
- Sparks JA, Chang SC, Liao KP, Lu B, Fine A.R, Solomon DH, Costenbader KH, Karlson EW. Rheumatoid arthritis and mortality among women during 36 years of prospective follow-up: Results from the Nurses' Health Study1. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2015;10.1002/acr.22752.
- Speidl WS, Toller WG, Kaun C, Weiss TW, Pfaffenberger S, Kastl SP, Furnkranz A, Maurer G, Huber K, Metzler H, Wojta J. Catecholamines potentiate LPS-induced expression of MMP-1 and MMP-9 in human monocytes and in the human monocytic cell line U937: possible implications for peri-operative plaque instability. *FASEB J.* 2004;18:603-5.
- Straub RH, Cutolo M, Buttgereit F, Pongratz G. Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. *J Intern Med.* 2010;267:543-60.
- Straub RH, Cutolo M. Involvement of the hypothalamic- pituitary-adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 493–507.
- Straub RH, Härle P. Sympathetic neurotransmitters in joint inflammation. *Rheum Dis Clin North Am.* 2005;31:43-59.
- Straub RH, Mayer M, Kreutz M, Leeb S, Schölmerich J, Falk W. Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes. *J Leukoc Biol.* 2000;67:553-8.

- Szardenings M. Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *J Recept Signal Transduct Res.* 2003;23:307-49.
- Szekanecz Z, Koch AE, Angiogenesis and its targeting in rheumatoid arthritis. *Vascul Pharmacol.* 2009; 51: 1–7.
- Taylor P, Miotla JM, Etherington P, Winlove P, Young Y, Paleolog E, Maini RN. VEGF release is associated with hypoxia in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:S296.
- Taylor PC, Sivakumar B. Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17:293-8.
- Terman JR, Mao T, Pasterkamp RJ, Yu HH, Kolodkin AL. MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell.* 2002;109:887-900.
- Theis KA, Helmick CG, Hootman JM. Arthritis burden and impact are greater among U.S. women than men: intervention opportunities. *J Womens Health (Larchmt).* 2007; 16:441-53.
- Thiede-Stan NK, Schwab ME. Attractive and repulsive factors act through multi-subunit receptor complexes to regulate nerve fiber growth. *J Cell Sci.* 2015;128:2403-14.
- Toyofuku T, Yoshida J, Sugimoto T, Zhang H, Kumanogoh A, Hori M, Kikutani H. FARP2 triggers signals for Sema3A-mediated axonal repulsion. *Nat Neurosci.* 2005;8:1712-9.
- Tran TS, Kolodkin AL, Bharadwaj R. Semaphorin regulation of cellular morphology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:263-92.
- Trzaska KA, Rameshwar P. Dopaminergic neuronal differentiation protocol for human mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol.* 2011;698:295-303.
- Uesugi K, Oinuma I, Katoh H, Negishi M. Different requirement for Rnd GTPases of R-Ras GAP activity of Plexin-C1 and Plexin-D1. *J Biol Chem.* 2009;284:6743-51.
- van Herwaarden N, van der Maas A, Minten MJ, van den Hoogen FH, Kievit W, van Vollenhoven RF, Bijlsma JW, van den Bemt BJ, den Broeder AA. Disease activity guided dose reduction and withdrawal of adalimumab or etanercept compared with usual care in rheumatoid arthritis: open label, randomised controlled, non-inferiority trial. *BMJ.* 2015;350:h1389.
- van Vollenhoven RF. Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5:531-41.
- Waimey KE, Huang PH, Chen M, Cheng HJ. Plexin-A3 and plexin-A4 restrict the migration of sympathetic neurons but not their neural crest precursors. *Dev Biol.* 2008;315:448-58.
- Wen H, Lei Y, Eun SY, Ting JP. Plexin-A4-semaphorin 3A signaling is required for Toll-like receptor- and sepsis-induced cytokine storm. *J Exp Med.* 2010;207:2943-57.
- Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:9784-8.

Yam PT, Charron F. Signaling mechanisms of non-conventional axon guidance cues: the Shh, BMP and Wnt morphogens. *Curr Opin Neurobiol.* 2013;23:965-73.

Yamamoto M, Suzuki K, Okuno T, Ogata T, Takegahara N, Takamatsu H, Mizui M, Taniguchi M, Chédotal A, Suto F, Fujisawa H, Kumanogoh A, Kikutani H. Plexin-A4 negatively regulates T lymphocyte responses. *Int Immunol.* 2008;20:413-20.

Yazdani U, Terman JR. The semaphorins. *Genome Biol.* 2006;7:211.

Zampeli E, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG. Treatment of rheumatoid arthritis: Unraveling the conundrum. *J Autoimmun.* 2015;65:1-18.

Zhang L, Polyansky A, Buck M. Modeling transmembrane domain dimers/trimers of plexin receptors: implications for mechanisms of signal transmission across the membrane. *PLoS One.* 2015;10:e0121513.

Zhou Y, Gunput RA, Pasterkamp RJ. Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci.* 2008;33:161-70.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rainer H. Straub für die Möglichkeit, an diesem Projekt zu arbeiten, und für die freundliche, kompetente Ausbildung und Unterstützung, die ich genossen habe. Vielen Dank auch an Prof. Dr. Jörg Heilmann für die nette Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Michael Szardenings für die kompetente Beratung in Sachen Phage display bedanken.

Vielen Dank an Prof. Werner Falk für die Unterstützung und fachliche Beratung zur Zucht von transgenen Mäusen.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Arbeitskollegen Dr. Torsten Lowin, Dr. Zsuzsa Jenei-Lanzl, Dr. Hubert Stangl und Dr. Susanne Klatt für die vielen guten, fachlichen Anregungen und Diskussionen. Vielen Dank geht an Madlen Melzer, Elena Underberg und Angelika Gräber für die freundliche Unterstützung im Labor.

Ich danke ganz herzlich meiner Familie, Jannes und Michael Kunath, für eure Geduld und liebevolle Unterstützung.

Ein Dankeschön an alle, die ich hier nicht namentlich genannt habe, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

8 Eidesstattliche Erklärung

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

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise geholfen:

Dr. Michael Szardenings, Fraunhofer Institut für Immunologie und Zelltherapie:

Bei der Planung und Durchführung des Phage display.

Dr Zsuzsa Jenei-Lanzl, Universitätsklinikum Regensburg:

Durch das zur Verfügungstellen von mesenchymalen Stammzellen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

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

Regensburg, den

