

Vergleichsstudie zur Serum-induzierten Arthritis im Kiefer- und Extremitätengelenk der Maus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Sema Safi, geb. Deniz

aus Lüdenscheid

2018

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. dent. Lina Gölz
2. Gutachter: Prof. Dr. med. dent. Helmut Stark

Tag der Mündlichen Prüfung: 24. Oktober 2018

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie
Direktor: Prof. Dr. med. dent. Andreas Jäger

Für meine Eltern und meinen Ehemann.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	8
1.	Einleitung	10
1.1.	Anatomie und Physiologie des Kiefergelenks	10
1.1.1.	Discus articularis	10
1.1.2.	Bilaminäre Zone	11
1.1.3.	Gelenkkapsel und Bänder	11
1.1.4.	Synovialgewebe	12
1.1.5.	Synovialflüssigkeit (Synovia)	12
1.1.6.	Histologie des Kiefergelenkknorpels	12
1.2.	Anatomie und Physiologie des Kniegelenks	15
1.2.1.	Bandapparat	16
1.2.2.	Menisken und Bursen	16
1.2.3.	Histologie des Kniegelenkknorpels	17
1.3.	Vergleichende Anatomie und Histologie zwischen Mensch und Maus	18
1.3.1.	Kniegelenk	18
1.3.2.	Kiefergelenk	18
1.4.	Rheumatoide Arthritis	19
1.4.1.	Allgemeines	19
1.4.2.	Endogene und exogene Einflussfaktoren	20
1.4.3.	Pathogenese: Auslösende Faktoren	22
1.4.4.	Inflammation	22
1.4.5.	Klinik und Diagnostik	24
1.4.5.1.	Histopathologische Diagnostik	25
1.4.6.	Therapie	25
1.5.	Rheumatoide Arthritis im Kiefergelenk	26
1.6.	Rheumatoide Arthritis im Kniegelenk	29
1.7.	Das K/BxN Modell: Ein Arthritis Tiermodell	29
1.8.	Fragestellung und Hypothese	31
2.	Material und Methoden	33
2.1.	Verwendete Reagenzien	33

2.2.	Verwendete Chemikalien	34
2.3.	Verwendete Geräte und Materialien	35
2.4.	Übersicht der Primärantikörper	36
2.5.	Übersicht der verwendeten ELISA Kits	36
2.6.	Übersicht des zeitlichen Verlaufs der Versuche	36
2.7.	Mausmodell	37
2.8.	Messungen der Gelenksschwellung	37
2.9.	Messungen der Fortbewegung	37
2.10.	Präparation	38
2.11.	Fixierung	38
2.12.	Mikro-Computertomographie	38
2.13.	Histologie	39
2.13.1.	Entkalkung	39
2.13.2.	Dehydrierung und Einbettung	40
2.13.3.	Schnittanfertigung	40
2.13.4.	Entparaffinierung	41
2.13.5.	Übersichtsfärbung: Hämatoxylin-Eosin (HE)	41
2.14.	Immunhistochemie	42
2.14.1.	Protokoll der immunhistochemischen Färbungen	42
2.15.	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	43
2.15.1.	ELISA Protokoll	43
2.16.	Auswertung und fotografische Dokumentation	44
2.17.	Statistische Auswertung	45
3.	Ergebnisse	46
3.1.	Gelenksschwellung	46
3.2.	Fortbewegung	47
3.3.	Mikro-Computertomographie	49
3.4.	Histologie	50
3.5.	Immunhistochemie	50
3.6.	ELISA Daten	56
4.	Diskussion	58
4.1.	Höhere Mechanische Belastung der Extremitätengelenke	61

4.2.	Anatomisch-histologische Gründe	62
4.3.	Prä- und Postnatale Entwicklung	63
4.4.	Zeitfaktor	63
4.5.	Weiterer Ausblick und Diskussion verschiedener Arthritismodelle	64
4.5.1.	Arthritismodelle für Phase I: Verlust der Eigentoleranz	65
4.5.2.	Arthritismodell für Phase II: Synovitis und Gelenkschäden	65
4.5.3.	Arthritismodell für Phase III: Etablierte/chronische Arthritis	66
4.6.	Schlussfolgerung	67
5.	Zusammenfassung	68
6.	Abbildungsverzeichnis	70
7.	Tabellenverzeichnis	71
8.	Literaturverzeichnis	72
9.	Danksagung	86
10.	Veröffentlichungen	87

Abkürzungsverzeichnis

ACPA	Antikörper gegen citrullinierte Proteine
ACR	American College of Rheumatology
Anti-GPI	Antikörper gegen Glucose-6-phosphat Isomerase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BSA	Bovine serum albumin
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
DE	Deutschland
DGRH	Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie
DMARD	Disease modifying antirheumatic drugs
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EULAR	European League Against Rheumatology
FRS	Fernröntgenseitenaufnahme
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
GPI	Glucose-6-phosphat Isomerase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Humaner Leukozytenantigen
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1
IL-	Interleukin-
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
Lig.	Ligament
RA	Rheumatoide Arthritis
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MRT	Magnetresonanztomographie
NF-κB	RANK-vermittelten Kernfaktors Kappa B
OA	Osteoarthritis
OPG	Osteoprotegerin
OPT	Orthopantomogramm
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
RANTES	Regulated and Normal T-cell Expressed and Secreted

RF	Rheumafaktor
RNAse	bovine Pankreasribonuklease
RT	Raumtemperatur
SE	Shared Epitope
TBS	tris-buffered saline
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
μ CT	Micro Computertomographie

1. Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie des Kiefergelenks

Die Kiefergelenke (lateinisch: *Articulatio temporomandibularis*) stellen einen Teil des stomatognathen Systems dar (Zilles et al. 2011). Ihre komplexen Bewegungsvorgänge dienen sowohl der Nahrungsaufnahme als auch dem Artikulieren beim Sprechen und Singen (Zilles et al. 2011). Topografisch befindet sich das Kiefergelenk anterior des äußeren Gehörganges (*Meatus acusticus externus*) und posterior der Wurzel des Jochbogens (Zilles et al. 2011). Es stellt die gelenkige Verbindung zwischen dem Schläfenbein (*Os temporale*) und dem Unterkiefer (*Corpus mandibulae*) dar und setzt sich aus eben diesen beiden knöchernen Anteilen zusammen (Zilles et al. 2011). Die dazwischenliegende Gelenkscheibe (*Discus articularis*) unterteilt das Gelenk in eine obere *discotemporale*, sowie eine untere, *discomandibuläre* Kammer (Zilles et al. 2011). Beim Kiefergelenk handelt es sich entsprechend um eine Diarthrose mit Gelenkspalten zwischen den artikulierenden Gelenkflächen und einer äußeren Gelenkkapsel, sowie verschiedenen Bändern (Zilles et al. 2011). Die Gelenkhöhle ist mit Synovialflüssigkeit gefüllt, welche im Rahmen der Gelenkbewegung die Reibung herabsetzt, sowie ernährende und reinigende Funktionen erfüllt (Zilles et al. 2011). Dorsal des Kiefergelenks befindet sich die sogenannte bilaminäre Zone (Zilles et al. 2011).

Eine Besonderheit des Kiefergelenks stellt die Tatsache dar, dass nicht nur ihre eigene Anatomie Einfluss auf die räumliche Lage der Gelenkskomponenten besitzt, sondern ebenso die Dentition (Strub 1994).

Bei Bewegungen des Unterkiefers artikuliert das walzenförmige *Caput mandibulae* des *Processus condylaris* des Unterkiefers mit der *Fossa mandibularis* und dem *Tuberculum articulare* des Schläfenbeins (Strub 1994).

1.1.1 *Discus articularis*

Er besitzt eine ovoide Form und ist eine bikonkave, gefäßfreie Bindegewebscheibe, welche auf dem *Caput mandibulae* aufsitzt und dieses unter physiologischen Bedingungen auch während der Rotations- oder Translationsbewegungen führt (Strub

1994) (Zilles et al. 2011). Der Discus ist peripher mit der Gelenkkapsel verwachsen. Es wird ein etwa 2 mm dickes anteriores Band von einer dünneren intermediären Zone (etwa 1 mm) und dem knapp 3 mm dicken posterioren Band unterschieden (Strub 1994). Das anteriore und posteriore Band bestehen aus straffem Bindegewebe, in das Knorpelzellen eingelagert sind (Strub 1994) (Zilles et al. 2011). In dem Teil des posterioren Bandes, welches auf dem Caput mandibulae aufliegt, findet sich reine Faserknorpelstruktur (Strub 1994). Die intermediäre Zone hingegen besteht lediglich aus straffem Bindegewebe (Zilles et al. 2011).

1.1.2 Bilaminäre Zone

Posterior geht der Discus articularis in die aus zwei Anteilen bestehende bilaminäre Zone über, die aus einer Lamina superior und inferior sowie einem retroartikulären Polster besteht. Die bilaminäre Zone ist reichhaltig innerviert und vaskularisiert (Zilles et al. 2011). Bei der Unterkieferbewegung übt der Kondylus eine Pumpfunktion auf die bilaminäre Zone aus, wodurch es zu einem physiologischen Wechsel des Innendrucks kommt (Graber 1991). Dieser ist eine wichtige Voraussetzung für das störungsfreie Gleiten der Gelenkflächen und spielt des Weiteren eine wesentliche Rolle für den Gelenkstoffwechsel (Graber 1991).

1.1.3 Gelenkkapsel und Bänder

Das Kiefergelenk wird von einer Gelenkkapsel (Capsula articularis) umschlossen, welche vom Schläfenbein zum Unterkiefer führt (Zilles et al. 2011). Sie ist reich an Blutgefäßen und mit Nerven versorgt und ist von einer Synovia (Membrana synovialis) ausgekleidet (Zilles et al. 2011). Die äußere fibröse Membran (Membrana fibrosa) besteht aus kollagenen Faserbündeln (Zilles et al. 2011).

Die Ligamenta laterale und mediale verstärken die Gelenkkapsel seitlich (Zilles et al. 2011). Das Ligamentum laterale (Ligamentum temporomandibulare) zieht vom Tuberculum articulare zur lateralen Seite des Collum mandibulae (Zilles et al. 2011). Das Ligamentum mediale befindet sich im medialen Bereich der Gelenkkapsel und ist variabel ausgeprägt (Zilles et al. 2011). Beide Bänder bestehen aus straffem

Bindegewebe und dienen im Wesentlichen der Gelenkführung und der Hemmung von Randbewegungen vor allem nach hinten (Zilles et al. 2011).

Die Ligamenta sphenomandibulare und stylomandibulare haben zwar keine direkte Beziehung zur Gelenkkapsel, doch beeinflussen sie gleichwohl die Kinematik des Unterkiefers (Zilles et al. 2011). Sie hemmen seine Endbewegungen und tragen dazu bei, ihn in seine ursprüngliche Lage zurückzuführen (Zilles et al. 2011).

1.1.4 Synovialgewebe

Das Synovialgewebe ist an der Innenseite der Gelenkkapsel lokalisiert und besteht aus zwei Schichten (Zilles et al. 2011). Die innere, an den Gelenkspalt grenzende Schicht ist die Intima. Sie ist zellreich, gut vaskularisiert und produziert die Synovialflüssigkeit (Zilles et al. 2011). Die Subintima grenzt an die Kapsel und ist avaskulär (Zarb 1985).

1.1.5 Synovialflüssigkeit (Synovia)

Die Gelenkhöhle ist gefüllt mit klarer Synovialflüssigkeit, hauptsächlich bestehend aus Dialysat des Blutplasmas, sowie Sekretionsprodukten (Welsch 2006). Die Synovia enthält Proteine, Hyaluronsäure, Glukose, Wasser und vereinzelt Lymphozyten (Welsch 2006). Wichtige Funktionen sind die Lubrikation, Stoßdämpfung, sowie Nutrition, womit die Synovialflüssigkeit dem Verschleiß der Gelenkflächen entgegenwirkt (Welsch 2006). Vor allem mit Hilfe des Glykoproteins Lubricin wird die Gleitfähigkeit des Gelenkknorpels an ihrer Oberfläche erhöht (Welsch 2006). Da die Knorpeloberflächen der Gelenkflächen nicht vaskularisiert sind, übernimmt die Synovia ihre Ernährung durch Diffusion, welche auf Bewegung mit Druck und Schub gefördert wird (Zarb 1985).

1.1.6 Histologie des Kiefergelenkknorpels

In Bezug auf die histologische Schichtung ist die Nomenklatur in der Literatur uneinheitlich beschrieben. In dieser Arbeit wird folgende Nomenklatur für die Unterteilung der histologischen Schichtung verwendet (siehe Abbildung 1):

1. Oberflächliche, fibröse Bindegewebszone

Als oberflächlichste Schicht, stellt die Bindegewebszone die eigentliche, artikulierende Gelenkfläche dar. Die Bindegewebszone besteht aus dichtem, fibrösem Bindegewebe mit Kollagenfasern, welche entsprechend ihrer funktionellen Belastung überwiegend parallel zur Oberfläche verlaufen (Bumann et al. 1999).

2. Proliferationszone

Die Proliferationszone besteht aus undifferenzierten Bindegewebszellen, die in tieferen Schichten u.a. zu Chondroblasten differenzieren. Die Proliferationszone bildet mit dem Faserknorpel eine Wachstumszone (Bumann et al. 1999).

3. Faserknorpelzone

Die Faserknorpelschicht besteht aus ungeordneten, hypertrophen Chondroblasten, welche zum Knochen hin weiter hypertrophieren. In die Tiefe verkalkt ihre Matrix zunehmend und geht schließlich in die Zone der enchondralen Ossifikation über (Bumann et al. 1999).

4. Enchondrale Ossifikationszone

Die enchondrale Ossifikationszone entsteht durch Resorption von Knorpel und Apposition von spongiösem Knochen (Bumann et al. 1999). Je nach Belastung kommt es in dieser Zone zu hypertrophen oder regressiven Adaptationsvorgängen (Bumann et al. 1999). Als einziges Gelenk im Körper sind die Gelenkflächen des Kiefergelenks mit Faserknorpel anstelle von hyalinem Knorpel überzogen (Benjamin et al. 2004). Faserknorpel ähnelt dem straffen Bindegewebe und zeichnet sich vor allem durch hohe Festigkeit und Widerstandfähigkeit aus (Benjamin et al. 2004). Er ist charakterisiert durch einen vergleichsweise zellarmen Aufbau mit entsprechend hohem Gehalt an Fasern (Benjamin et al. 2004). Der hohe Anteil an Kollagen Typ-I wird für die Widerstandfähigkeit verantwortlich gemacht, während die stark verflochtenen kollagenen Faserbündel die Festigkeit ergeben (Benjamin et al. 2004). Im Gegensatz zu hyalinem Knorpel besteht die Grundsubstanz des Faserknorpels aus weniger Matrixbestandteilen,

während der Anteil an Kollagenfasern vom Typ-I höher ist, was dem Faserknorpel die genannte größere Widerstandsfähigkeit gegen Kompressionskräfte verschafft (Benjamin et al. 2004).

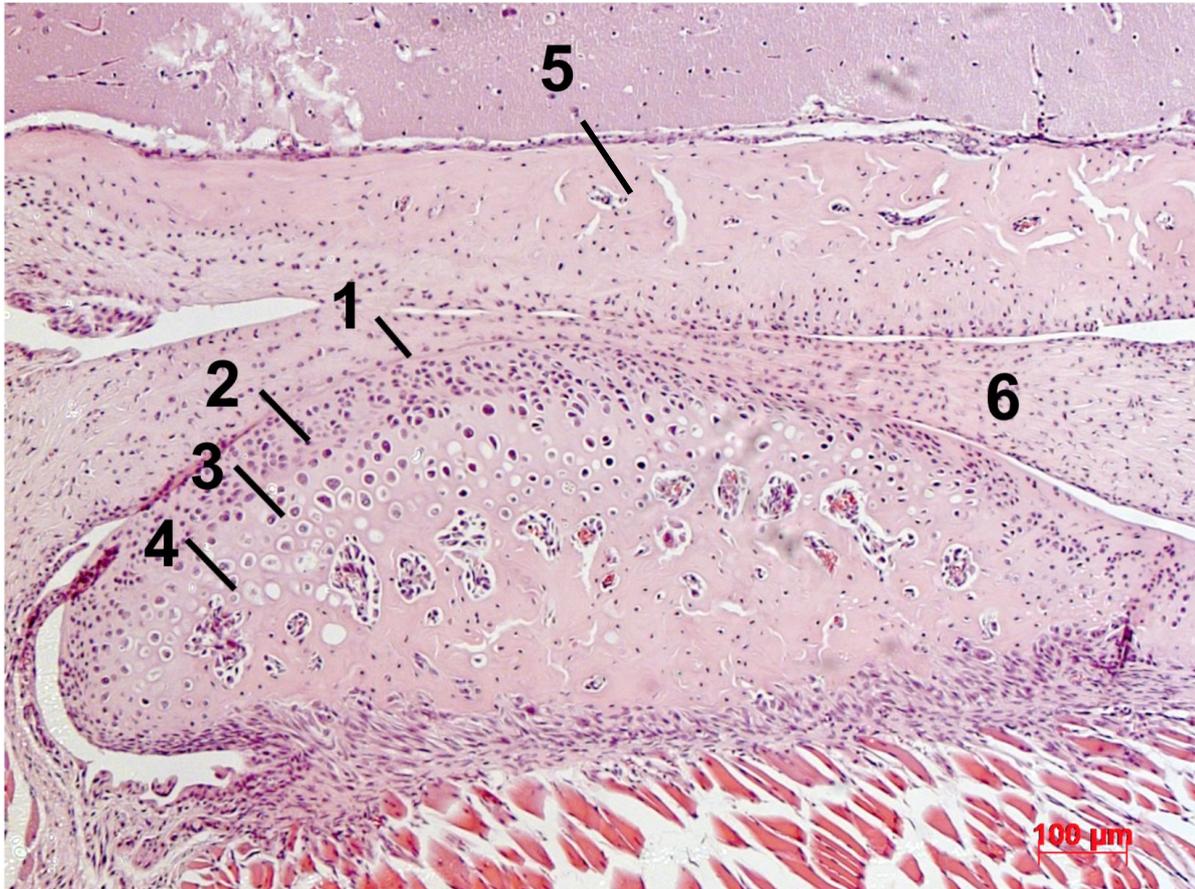


Abb. 1: Histologischer Aufbau des kondylären Knorpels einer 8 Wochen alten Maus; HE Färbung (10x)

1: Fibröse Bindegewebszone; 2: Proliferationszone; 3: hypertrophe Knorpelzone (später Faserknorpel); 4: Enchondrale Ossifikationszone; 5: Fossa mandibularis; 6: Diskus;

Typ-II Kollagen macht circa 40 % der Kollagenfasern aus und kommt hingegen fast ausschließlich in der Matrix hypertropher und reifender Zellen vor (Mizoguchi et al. 1990) (Mizoguchi et al. 1992). Insgesamt ist der Faserknorpel dadurch weniger elastisch als hyaliner Knorpel und besitzt einen geringeren Wasseranteil (Mizoguchi et al. 1992). Faserknorpel entwickelt sich aus straffem Bindegewebe, in dem sich Fibroblasten zu Chondrozyten differenzieren (Mizoguchi et al. 1992). Die Umwandlung erfolgt unter Einfluss von Zug- und Druckreizen (Karaharju-Suvanto et al. 1996). Durch

unphysiologische Belastungen bzw. fehlende funktionelle Belastung des Kiefergelenks wird der Anteil von Typ-I Kollagen zulasten des Typ-II Kollagen Gehalts erhöht (Karaharju-Suvanto et al. 1996).

1.2 Anatomie und Physiologie des Kniegelenks

Das Kniegelenk (*Articulatio genus*) ist das größte Gelenk des menschlichen Körpers und bildet die gelenkige Verbindung zwischen Oberschenkelknochen (Femur), Schienbein (Tibia) und Kniescheibe (Patella) (Zilles et al. 2011) (siehe Abbildung 2). Als eine *Articulatio bicondylaris* lässt sich das Kniegelenk entsprechend in zwei räumlich voneinander getrennte Gelenke trennen – die *Articulatio femorotibialis* und die *Articulatio femoropatellaris* (Zilles et al. 2011). Erstere wird durch die dazwischenliegenden Meniski weiter eingeteilt in eine *Articulatio meniscofemoralis* und *Articulatio meniscotibialis* (Zilles et al. 2011). Die mit Knorpel überzogenen Gelenkflächen werden Kondylen genannt (Zilles et al. 2011). Zwischen ihnen liegen die mit der Gelenkkapsel verwachsenen Menisken (Zilles et al. 2011). Durch die Seiten- und Kreuzbänder wird das Kniegelenk gegen Verschiebungen der knöchernen Strukturen gegeneinander gesichert (Zilles et al. 2011). Es wird zudem umgeben von zahlreichen Schleimbeuteln, die sich beispielsweise bei Entzündung vergrößern können und zum Teil mit der Gelenkkapsel kommunizieren (Zilles et al. 2011).

Das Kniegelenk ist ein Drehgleitgelenk (*Trochoginglymus*) und besitzt zwei Freiheitsgrade (Zilles et al. 2011). Es kann gebeugt und gestreckt werden (Zilles et al. 2011) (Wirtz 2010). In der Beugeposition kann außerdem eine axiale Längsrotation ausgeführt werden (Wirtz 2010). Das Kniegelenk ist in aufrechter Position der Belastung des Teilkörpergewichtes ausgesetzt und muss entsprechend in dieser Streckstellung eine hohe Stabilität gewährleisten (Wirtz 2010). Zusätzlich muss das Kniegelenk in Beugestellung Bewegungsraum für den Verkehrsraum des Fußes bieten (Wirtz 2010).

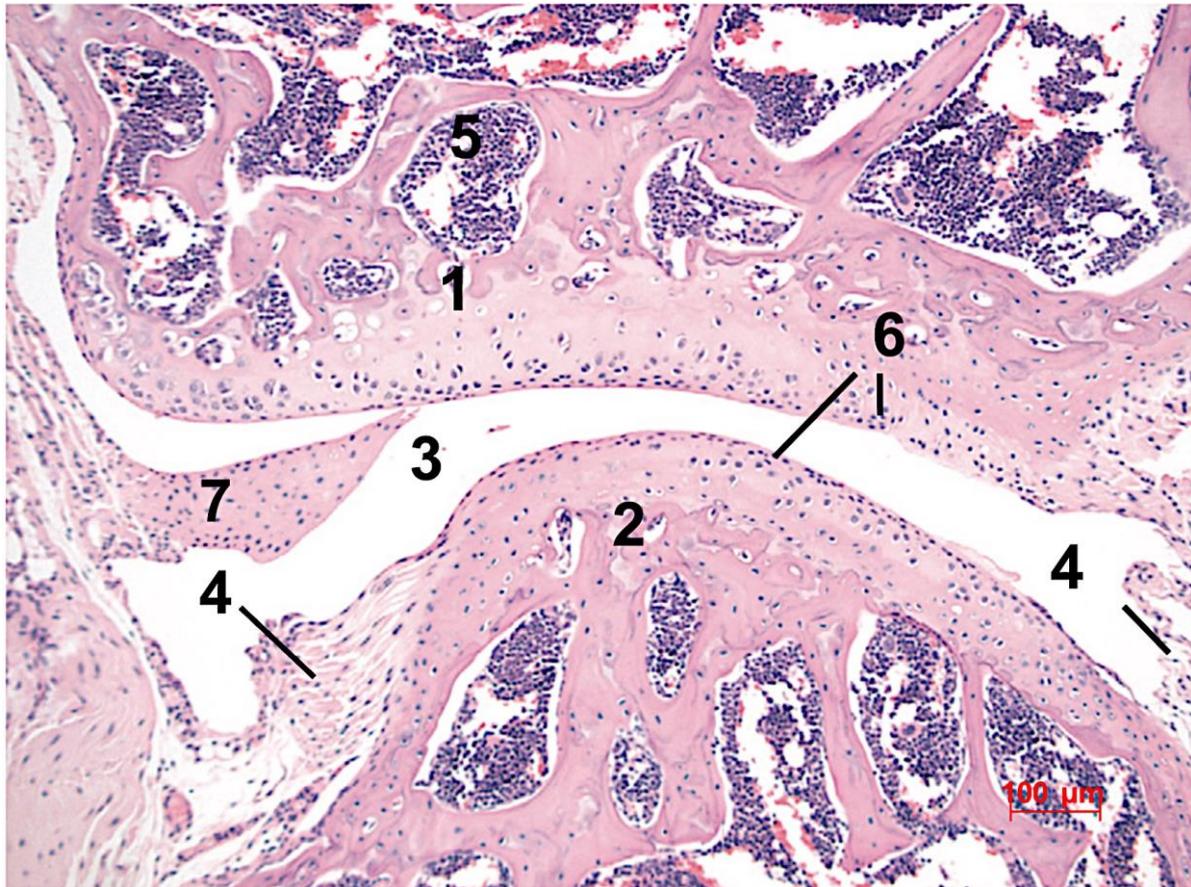


Abb. 2: Histologischer Aufbau des Kniegelenks einer 8 Wochen alten Maus; HE Färbung (10x)

1: Femur; 2: Tibia; 3: Gelenkspalt; 4: Synovialgewebe; 5: Knochenmark;
6: Gelenkknorpel; 7: Meniskus

1.2.1 Bandapparat

Wie oben bereits erwähnt, sind die rein knöchernen Strukturen des Kniegelenkes wenig kongruent zueinander und daher sehr instabil (Wirtz 2010). Das Gelenk wird erst durch die Anwesenheit seiner zahlreichen Bänder stabilisiert (Wirtz 2010). Je nach Lokalisation können sie eingeteilt werden in vordere, seitliche, hintere und zentrale Bandkomplexe (Wirtz 2010).

1.2.2 Menisken und Bursen

Die Inkongruenz der artikulierenden Knochenflächen wird ausgeglichen durch die halbmondförmigen Menisken (Wirtz 2010). Sie bestehen aus Faserknorpel und haben im Querschnitt eine Keilform (Wirtz 2010). Die Menisken werden mit zunehmendem

Alter weniger vaskularisiert, bis sie im Erwachsenenalter an inneren Abschnitten, insbesondere der Meniskusschneide, avaskulär sind. (Scapinelli 1968).

Das Kniegelenk wird zudem von diversen Schleimbeuteln umgeben, welche zum Teil mit dem Gelenkraum kommunizieren, und zum Teil unabhängig von ihr sind (Wirtz 2010). Sie können sich bei Entzündung vergrößern und schützen vor Schäden an den Sehnen, welche über das Kniegelenk ziehen (Wirtz 2010).

1.2.3 Histologie des Kniegelenkknorpels

Der Kniegelenkknorpel besteht aus hyalinem Knorpel und lässt sich in vier Schichten gliedern (Welsch 2006):

1. Tangentialfaserschicht

In dieser Schicht verlaufen die Kollagenfibrillen parallel zur Oberfläche oder bilden bogenförmige Strukturen mit einem Scheitelpunkt, der zur Oberfläche weist (Welsch 2006). In dieser Schicht sind viele, schmale Fibrillen zu sehen und die Chondrozyten gestalten sich spindelförmig mit einem Verlauf ebenfalls parallel zur Oberfläche (Welsch 2006).

2. Übergangszone

In dieser Zone liegen Chondrozyten oft vereinzelt vor oder treten in Paaren auf. Die Kollagenfibrillen kreuzen sich hier (Welsch 2006).

3. Radiärzone

Sie ist die breiteste Schicht, in der die Kollagenfibrillen beinahe senkrecht zur Oberfläche verlaufen, wobei sie lockerer verteilt sind und breiter als an der Oberfläche (Welsch 2006). Die Chondrozyten treten als längliche, gleichförmige Zellgruppen auf, welche parallel zu den radiären Kollagenfibrillen verlaufen (Welsch 2006). An der Grenze zur darauffolgenden mineralisierten Knorpelschicht befindet sich die ca. 2–5 µm breite „tide mark“- eine kalziumreiche Schicht, unbekannter Funktion (Welsch 2006).

4. Mineralisierter Knorpel

Diese Schicht liegt dem subchondralen Knochen auf und weist relativ wenige Chondrozyten auf (Welsch 2006). Sie scheint eine tragende Rolle bei der Druckübertragung zu spielen und verhindert eine Abscherung des Knorpels von der Knochenoberfläche (Welsch 2006). Die Knorpel-Knochen-Grenze ist gekennzeichnet durch zahlreiche Verzahnungen der beiden Gewebe ineinander (Welsch 2006). Das enchondrale Knochenwachstum der Heranwachsenden findet in dieser Zone statt (Welsch 2006). Selbst nach Wachstumsende kann es in dieser Schicht zu Um- und Neubildung von Knochen kommen (Welsch 2006).

1.3 Vergleichende Anatomie und Histologie zwischen Mensch und Maus

1.3.1 Kniegelenk

Die Anatomie und Histologie des Kniegelenks ist bei den meisten Säugetieren weitestgehend analog (Chang et al. 2016) (Benninghoff et al. 2008). Es gibt für die vorliegende Arbeit unwesentliche Unterschiede in Bezug auf den Bandapparat zwischen Maus und Mensch (Chang et al. 2016).

Ebenfalls sind die wichtigsten Weichteilstrukturen des Kniegelenks - darunter Synovia, Meniskus, Gelenkkapsel, Sehnen - zwischen Mensch und Maus sehr ähnlich (Dintzis et al. 2011).

Der Kniegelenksknorpel der Maus ist insgesamt in Relation dünner, dabei können alle vier Schichten des für den menschlichen erwachsenen Gelenkknorpel charakteristischen Schichten ebenfalls unterschieden werden. Eine Tidemark ist bei Mäusen nicht erkennbar.

1.3.2 Kiefergelenk

Ähnlich wie bei dem Kniegelenk herrscht bei dem Kiefergelenk in vielen morphologischen Aspekten eine Analogie zwischen Mensch und Maus. Nichtsdestotrotz existieren einige Unterschiede und Variationen der anatomischen Strukturen:

So ist die Fossa glenoidales der Maus flacher, als die des Menschen. Ebenso besitzt die Maus keine erhabene artikuläre Eminenz, wie sie beim Menschen üblich ist. Der seitliche Pterygoidmuskel hat außerdem bei der Maus weniger Volumen und entsprechend weniger Kontraktionskraft im Vergleich zum Menschen (Suzuki et al. 2016) (Hinton 2014).

Die Morphogenese des Kiefergelenks in der Maus ähnelt weitgehend der Abfolge beim Menschen: Zunächst kommt es zu einer mesenchymalen Kondensation, die zu Kondylen, Unterkieferfossa und Gelenkscheibe werden. Anschließend folgt die Differenzierung der Chondrozyten in den tieferen Schichten des kondylaren Knorpels und die Knochenbildung in der mandibulären Fossa. Der Prozess endet mit der Bildung der Gelenkscheibe und der oberen und unteren Gelenkpfanne (Shibata et al., 1996; Gu et al., 2008). Als Unterschied ist anzumerken, dass sich die obere Gelenkhöhle bei der Maus im Gegensatz zum Menschen zuerst bildet (Hinton 2014).

1.4 Rheumatoide Arthritis

1.4.1 Allgemeines

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA; Synonym: Chronische Polyarthritis, „Gelenkrheuma“) handelt es sich um eine chronisch-entzündliche, progressiv verlaufende Autoimmunerkrankung, die sich artikulär und systemisch manifestiert (Costenbader et al. 2008). In den Industrieländern liegt die Prävalenz bei 0,5 – 2 % der Bevölkerung (Kalla et al. 2003) (FRIEDL 2011). 2008 erkrankten laut der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie 440.000 Menschen an der RA. Man geht von einer höheren Dunkelziffer aus, da sich die Diagnose der RA häufig differentialdiagnostisch schwierig gestaltet (FRIEDL 2011). Die Prävalenz der RA variiert geographisch (Costenbader et al. 2008) und ist in Nordeuropa, sowie Nordamerika am weitesten verbreitet (Kalla et al. 2003). Es wird angenommen, dass dies mit den unterschiedlichen genetischen Risiken und Umweltbelastungen jener Regionen zusammenhängt (Doran et al. 2002) (Kaipiainen-Seppänen et al. 2006).

Bei der RA handelt es sich um eine komplexe, multifaktorielle Erkrankung. Die genauen Ursachen der Erkrankung sind trotz intensiver Recherchen immer noch nicht gänzlich

geklärt (Hemminki et al. 2009) (Padyukov et al. 2004). Allerdings herrscht weitestgehend Konsens darüber, dass es sich um eine autoimmune Ursache handelt, bei der körpereigene Substanzen, wie zum Beispiel der Gelenkknorpel, von Zellen des Immunsystems angegriffen werden (Hemminki et al. 2009) (Padyukov et al. 2004). Dabei muss zwischen dem *Auslöser* der fehlerhaften Immunreaktion und weiteren *endogenen und exogenen Faktoren* unterschieden werden, die diese Reaktion im Immunsystem begünstigen und aufrechterhalten (Hemminki et al. 2009) (Padyukov et al. 2004). Die derzeitige Evidenzlage zu diesem Thema konnte eine Beteiligung der angeborenen und erworbenen Immunität einschließlich humoraler und zellulärer Antworttypen aufzeigen.

1.4.2 Endogene und Exogene Einflussfaktoren

Der bedeutendste **endogene Einflussfaktor** ist eine genetische Prädisposition (Hemminki et al. 2009) (Padyukov et al. 2004). Zwillingsstudien konnten einen genetischen Einfluss mit dem Auftreten einer RA in Zusammenhang bringen bei Konkordanzraten von 15 bis 30 % bei eineiigen Zwillingen und 5 % bei zweieiigen Zwillingen. (Hemminki et al. 2009) (Padyukov et al. 2004) (McInnes et al. 2011). Eine Assoziation mit bestimmten Allelen des humanen Leukozytenantigen (HLA) -DRB1-Locus wurde bei Patienten gefunden, die den Rheumafaktor (RF) oder Antikörper gegen citrullinierte Proteine (ACPA) im Serum aufzeigten (McInnes et al. 2011).

Diese HLA-Allele kodieren für ein gemeinsames Aminosäuremotiv, welches als „Shared Epitope“ (SE) bezeichnet wird. Die bisher bekannte Funktion dieses Moleküls ist die Präsentation von Peptiden an CD4+ T-Zellen (Lipsky et al. 1998). Jedoch ist immer noch unklar, durch welchen genauen Mechanismus das Molekül die Krankheitsinduktion beeinflusst (Lipsky et al. 1998). Etwa 80-90 % aller kaukasischen RA-Patienten sind positiv für solche HLA-DRB1-Allele. Der Nachweis dieser Allele geht mit einem bis zu vierfach erhöhten RA-Erkrankungsrisiko einher (Prots et al. 2006) (Tanaka et al. 1999) (O'Dell et al. 1998) (Nepom et al. 1996) (Todd et al. 1988) (Deighton et al. 2006) (Balsa et al. 2010).

Auf molekularbiologischer Ebene sind zusätzlich Mutationen des Transkriptionsfaktors

FOXP3 von wichtiger Bedeutung, da diese zu einer Unterdrückung von regulatorischen T-Zellen führen können, wodurch wiederum die Ausbildung der RA begünstigt wird (Tao et al. 2017).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der zu einer fehlerhaften Immunantwort und damit zur Entstehung einer RA beiträgt, ist das Vorhandensein von Autoantikörpern, deren Entdeckung die Diagnostik und Prognose der Erkrankung entscheidend beeinflusst haben (Smolen et al. 2010). Ihre Anwesenheit (Seropositivität) ist assoziiert mit einem schwerwiegenderen Krankheitsverlauf und einer erhöhten Morbidität (Honda et al. 2012) (Van Gaalen et al. 2004) (Aletaha et al. 2015) (Gonzalez et al. 2008) (Scher et al. 2015). Der klassische Autoantikörper ist der Rheumafaktor, welcher sich gegen den Fc-Anteil des Immunglobulin G richtet (Sokolove et al. 2014). Die daraus resultierende Immunkomplexbildung wird von Makrophagen gebunden, teilweise phagozytiert und bildet somit den Auftakt für eine Entzündungskaskade (Anquetil et al. 2015). Der RF kommt bei ca. 70 % aller Erkrankten vor und dient als ein diagnostischer Marker für die Erkrankung (Sokolove et al. 2014) (Anquetil et al. 2015). Noch höhere Spezifität und Sensitivität bieten die ACPA (Antikörper gegen citrullinierte Proteine) (Zhao et al. 2008). Citrullinierte Proteine sind physiologischerweise (u.a. in der Synovialflüssigkeit der Gelenke) vorhanden und werden von den ACPA als körperfremd erkannt (Zhao et al. 2008) (Sabharwal et al. 1982) (Anquetil et al. 2015). Die Autoaggression kann im weiteren Verlauf durch eine Entzündungskaskade hervorgerufen werden oder als Folge einer Aktivierung von Osteoklasten einen direkten Knochenabbau bedingen (Harre et al. 2012).

Interessanterweise können zirkulierende ACPA bis zu zehn Jahre vor dem Ausbruch einer klinisch manifesten RA diagnostiziert werden (prä-RA) (Smolen et al. 2010). Ihre Konzentration nimmt gemeinsam mit jener der Zytokine im weiteren Verlauf der RA zu (Nielen et al. 2004).

Der wichtigste **exogene Faktor** ist das Rauchen, wodurch sich das RA-Erkrankungsrisiko verdoppelt (Ludvigsson et al. 2014). Andere mögliche Umweltrisikofaktoren sind Alkoholkonsum, Kaffeekonsum, Vitamin-D-Mangel, orale Kontrazeptiva sowie ein niedriger sozioökonomischer Status, wobei die Studienlage für diese genannten Faktoren limitiert ist (Liao et al. 2009).

1.4.3 Pathogenese: Auslösende Faktoren

In Bezug auf die Initiation des Krankheitsausbruches sind zunehmend verschiedene bakterielle, sowie virale Infekte in den Fokus intensiver Untersuchungen getreten. Zu den viralen Erregern, welche mit der RA assoziiert werden, zählen z.B. das Epstein-Barr-Virus, Zytomegalie-Virus und verschiedene Proteus-Spezies, sowie deren Stoffwechselprodukte (McInnes et al. 2011). Während der Infektion können Immunkomplexbildungen zu einer Induktion des RF führen (McInnes et al. 2011).

Verschiedene bakterielle Auslöser sind ebenfalls mit der Initiation der RA assoziiert. So konnten Zusammenhänge zwischen der Erkrankung und gastrointestinalen (z.B. Proteus mirabilis), sowie oralen bakteriellen Proteinen, z.B. Porphyromonas gingivalis, nachgewiesen werden (Scher et al. 2016) (Wegner et al. 2010). Letzteres scheint in der Lage zu sein, unter der Bildung eines bestimmten Enzyms, Proteine zu citrullinieren und auf diese Weise bei bestehender o.g. Autoaggression gegen dieselbigen die Bildung einer RA zu unterstützen (Maresz et al. 2013). Dies stellt eine mögliche Erklärung dar für die Assoziation von parodontalen Erkrankungen und dem Auftreten der RA (Silvestre-Rangil et al. 2016) (Golz et al. 2016).

Ein möglicher Erklärungsansatz für diese bakteriellen und viralen Assoziationen besteht in der sogenannten molekularen Mimikry, welche die Ähnlichkeit von pathogenen Peptidsequenzen zu körpereigenem Gewebe beschreibt (Scher et al. 2016). Diese Peptidsequenzen können ihrerseits zu einer Aktivierung autoreaktiver T- und B-Zellen führen und schließlich eine Autoimmunerkrankung auslösen (Scher et al. 2016) (Wegner et al. 2010) (Ebringer et al. 2000).

1.4.4 Inflammation

Die RA wird am besten charakterisiert als ein klinisches Syndrom, welches mehrere Krankheitssubgruppen umfasst (Scott et al. 2010). Diese unterschiedlichen Subgruppierungen führen zu unterschiedlichen Entzündungskaskaden, die aber schließlich alle zu einem gemeinsamen Endpfad führen, in dem persistierende synoviale Entzündungen und damit verbundene Schädigungen des Gelenkknorpels und des

darunterliegenden Knochens vorliegen (Scott et al. 2010) (van der Helm-van et al. 2008) (van Oosterhout et al. 2008).

Die klinisch charakteristische Gelenksschwellung ist bedingt durch eine Entzündung der Synovialmembran, welche wiederum Folge einer Immunaktivierung durch eine Leukozyteninfiltration in das normalerweise dünn besiedelte Synovialkompartiment ist (Smolen et al. 2010). Das zelluläre Infiltrat der Synovitis bei der RA umfasst sowohl Zellen des angeborenen Immunsystems (z. B. Monozyten, dendritische Zellen, Mastzellen und angeborene lymphatische Zellen) als auch Zellen des erworbenen Immunsystems (z. B. T-Helfer-1 und T-Helfer-17 Zellen, B-Zellen, Plasmablasten und Plasmazellen) (Smolen et al. 2010). Eine anschließende ausgeprägte Gewebereaktion im Zusammenspiel mit einem verstärkten Chondrozytenkatabolismus und synovialer Osteoklastogenese fördert die Gelenkzerstörung (Smolen et al. 2010).

Das entzündliche Milieu der Synovia wird durch ein komplexes Netzwerk von Zytokinen und Chemokinen aufrechterhalten (Codarri et al. 2011). Verschiedene Studien konnten aufzeigen, dass unter diesen der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin 6 (IL-6), sowie der Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) eine besondere Bedeutung innehaben (Smolen et al. 2010) (Codarri et al. 2011). Letzterer hat sich bereits bei anderen Autoimmunerkrankungen wie der multiplen Sklerose als ein Schlüsselfaktor erwiesen (Codarri et al. 2011).

Diverse Zytokine und Chemokine aktivieren Endothelzellen und locken Immunzellen an, wodurch eine Entzündungsreaktion in Gang gebracht oder verstärkt wird (Pettit et al. 2001). Aktivierte Fibroblasten, T- und B-Zellen, sowie Monozyten und Makrophagen leiten schließlich durch die Aktivierung des Receptor Activator of NF- κ B (RANK) Rezeptors die Osteoklastenbildung ein (Pettit et al. 2001) (Redlich et al. 2002). Ausgehend von den kahlen Bereichen zwischen Knorpel, periostaler Synovialmembran und Knochen breiten sich so Knochenerosionen aus (Martel-Pelletier et al. 2001). Das Knorpelgewebe wird durch katabole Chondrozyteneffekte, sowie Zytokinstimulationen erodiert und schließlich durch Matrix-Metallo-Proteinasen und andere Enzyme degradiert (Martel-Pelletier et al. 2001).

Entsprechend des systemischen Charakters der RA lassen sich bei betroffenen Patienten neben der lokalen Gelenksinflammation ebenfalls systemisch diverse Entzündungsmarker nachweisen. Darunter zählen u.a. das in Bezug auf Monozyten und CD4 T-Zellen chemotaktisch aktive RANTES, TNF- α , sowie Interleukin-1 β (IL-1 β). Letzteres scheint zudem mit der klinischen Krankheitsaktivität zu korrelieren (Eastgate et al. 1988) (Petrovic-Rackov et al. 2006) (Yao et al. 2006).

1.4.5 Klinik und Diagnostik

Das klinische Erscheinungsbild der RA kann interindividuell in Symptom, Lokalisation und Ausprägungsgrad sehr facettenreich und unterschiedlich sein (Ludvigsson et al. 2014). Die klinische Heterogenität der RA in Bezug auf Symptomatik und Ausprägungsgrad ist vermutlich der oben genannten Fülle an möglichen Effektor-Immunmechanismen, welche ihrerseits mit einer Vielzahl von ätiopathogenen Determinanten assoziiert sind, geschuldet (Ludvigsson et al. 2014). Patienten, die an einer Arthritis erkrankt sind, leiden unter anhaltenden Gelenkentzündungen, die durch Gelenkschmerzen, Steifheit und Schwellungen gekennzeichnet sind und in mehreren Gelenken zu einer fortschreitenden Zerstörung von Knorpel und Knochen führen (Sculco 1998). Bei unzureichender Behandlung kann der Entzündungsprozess eine dauerhafte Zerstörung und Deformierung der Gelenke fördern (Sculco 1998). Systemische Symptome wie Müdigkeit, Anämie und leichtes Fieber können ebenfalls vorhanden sein (Sculco 1998). Patienten mit schwereren Erkrankungen können auch extraartikuläre Manifestationen wie Perikarditis, Myokarditis, Vaskulitis und Lungenfibrose aufweisen (Sculco 1998). Insgesamt ist die Krankheit mit erheblichen Behinderungen und Verlust der Arbeitsfähigkeit verbunden (Ishikawa et al. 2014)

Die Diagnosestellung erfolgt heute in der Regel in Anlehnung an die Kriterien des American College of Rheumatology (ACR-Kriterien) und der European League Against Rheumatology (EULAR-Kriterien) (Villeneuve et al. 2010). Sie wurden entwickelt, um eine möglichst frühzeitige Diagnose der Erkrankung zu ermöglichen und entsprechende Therapiemaßnahmen zu ergreifen (Villeneuve et al. 2010). Die Abbildung 3 zeigt die gültigen Kriterien und deren Wertung.

2010 ACR-/EULAR-Klassifikationskriterien der rheumatoiden Arthritis (RA) (6)*					
Punkte	0	1	2	3	5
geschwollene/ schmerzhafte Gelenke	≤ 1 (mittel)großes	2–10 (mittel)große	1–3 kleine	4–10 kleine	mind. 11 einschl. kleiner Gelenke
Serologie RF und ACPA	negativ		mind. 1 schwach pos.	mind. 1 hoch pos.	
akute Phase CRP und BSG	normal	mind. 1 erhöht			
Symptombdauer	< 6 Wochen	ab 6 Wochen			

* Grundvoraussetzung für die Anwendung der Kriterien ist die Sicherung eines geschwollenen Gelenks und der Ausschluss einer anderen Ursache der Gelenksbeschwerden. Ab 6 Punkten gilt eine RA als gesichert (RF = Rheumafaktor; ACPA = Antikörper gegen citrullinierte Peptide/Proteine). Der Nachweis von RA-typischen Erosionen sichert die RA auch ohne die übrigen Kriterien. PPV (85–97 %); ACR, American College of Rheumatologie; EULAR, European League against Rheumatism; CRP, C-reaktives Protein; BSG, Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit; pos., positiv; mind., mindestens; einschl., einschließlich

Abb. 3: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien der Rheumatoiden Arthritis 2010 (Schneider et al. 2013)

1.4.5.1 Histopathologische Diagnostik

Die Membrana synovialis ist in der Regel geschwollen und entzündlich infiltriert, wobei zu Beginn die neutrophilen Granulozyten und im weiteren Verlauf die T-Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, sowie Mastzellen dominieren (Welsch 2006). Es werden vergrößerte und vermehrte Synoviazysten, sowie geschwollene, gefäßreiche Zotten gefunden (Welsch 2006). Bei Letzterem handelt es sich um entzündlich verändertes Pannusgewebe, das auf dem Gelenkknorpel wächst und zu dessen Schädigung führt (Welsch 2006). Der Entzündungsvorgang erstreckt sich vom Knorpel hinaus und befällt ebenso Knochen, Sehnen und Muskeln der Umgebung (Welsch 2006). Der Gelenkknorpel selbst ist ebenfalls pathologisch verändert und u.a. gekennzeichnet durch einen Rückgang des Proteoglykangehalts, was wiederum zu Einbußen der Belastbarkeit des Knorpels führt (Welsch 2006). Die Gelenkflüssigkeit ist bei der RA infiltriert von neutrophilen Granulozyten und später auch T-Lymphozyten sowie diversen Immunglobulinen (z.B. RF) (Welsch 2006).

1.4.6 Therapie

Die heutige Therapie der RA basiert medikamentös primär auf Glukokortikoiden, Disease modifying antirheumatic drugs (DMARD) und Biologika (Hettenkofer et al. 2014).

Am häufigsten ist der Einsatz der Glukokortikoide, die vor allem aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung im akuten Stadium angewendet werden (Hettenkofer et al. 2014). Laut Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRH) ist initial eine hohe Dosierung zu empfehlen, die dann schrittweise adaptiert an die auftretenden Nebenwirkungen der Glukokortikoide zugunsten der DMARDs reduziert werden (Schneider 2011). Zu den am häufigsten verwendeten DMARDs gehören Methotrexat, Azathioprin und Cyclophosphamid (Hettenkofer et al. 2014). DMARDs stellen in der Basistherapie first-line Medikamente dar, deren Wirkung nach 2-3 Monaten ab Beginn der Therapie eintritt (Hettenkofer et al. 2014). Ihre antientzündliche, antiproliferative und antiangiogenetische Wirkung können ein Fortschreiten der Gelenkdestruktion verhindern, sodass sie laut Leitlinie der DGRH möglichst frühzeitig eingesetzt werden sollen (Hettenkofer et al. 2014) (Schneider 2011).

Biologika modifizieren die Interaktion zwischen T- und B-Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1, IL6-). Biologika wie Infliximab, als monoklonalen Antikörper gegen TNF- α kommen in Betracht, wenn die Basistherapie mittels DMARDs und Glukokortikoiden nicht mehr wirksam ist (Hettenkofer et al. 2014) (Schneider 2011).

Eine chirurgische Therapie kommt in Frage, sobald konservative Maßnahmen erfolglos bleiben und die Erkrankung fortschreitet. Die operativen Maßnahmen basieren darauf, das erkrankte Gewebe zu entfernen und bei Bedarf den knöchernen Defekt zu rekonstruieren, z.B. mittels Gelenkersatz oder Einlage von speziellen Gelenkimplantaten (Hettenkofer et al. 2014).

1.5 Rheumatoide Arthritis im Kiefergelenk

Bei 67-71 % der Patienten, die an einer RA erkranken, manifestieren sich entsprechende Symptome im Kiefergelenk (O'Connor et al. 2017). Jedoch hängt die tatsächliche Prävalenz von der untersuchten Bevölkerung, den diagnostischen Kriterien und den Mitteln zur Beurteilung des Kiefergelenks ab (O'Connor et al. 2017).

Die juvenile idiopathische Arthritis (JIA) ist ebenfalls eine Gelenkerkrankung des rheumatischen Formkreises. Sie betrifft Heranwachsende und tritt definitionsgemäß vor dem 16. Lebensjahr auf. Die Erkrankungsdauer beträgt mindestens 6 Wochen

(Hettenkofer et al. 2014). Die Beteiligung des Kiefergelenks ist bei der JIA häufig, wobei Entzündungen und osteochondrale Veränderungen mit kontrastverstärkter MRT bei etwa 40 % der Patienten beobachtet werden können (Manners et al. 2002). Die JIA mit Kiefergelenksbeteiligung nimmt innerhalb der Zahnmedizin eine besondere Bedeutung ein, da sich das Wachstumszentrum des Unterkiefers unterhalb der fibroknorpeligen Gelenkoberfläche des Kondylus befindet und sehr anfällig für arthritische Veränderungen ist (Miller et al. 2018). Schwerwiegende Wachstumsstörungen des Unterkiefers in allen drei Raumebenen können daher die Folge sein (Miller et al. 2018).

Die Konsequenz können sowohl mandibuläre Retrognathie, offener Biss als auch faciale Asymmetrien in der Transversalebene sein (siehe Abbildung 4 und 5). Allerdings kann auch bei einer RA des Kiefergelenkes im Erwachsenenalter mit progredienten Veränderungen der selben Art zu rechnen sein.

Bei einer vorangeschrittenen arthritischen Erkrankung des Kiefergelenks umfassen die radiographischen Merkmale entsprechende charakteristische Erosionen, Resorption, Abflachung sowie Sklerose der Gelenkkondylen und der Fossa glenoidalis (Bag et al. 2014). Später können zudem Osteophytenbildungen im Kondylenkopf beobachtet werden (Bag et al. 2014). Des Weiteren kann es zu einer Verkleinerung des Gelenkspaltes, zur Bildung subchondraler Zysten und zu einem zugespitzten Kondylus oder sogar zur vollständigen Zerstörung des Caput mandibulae kommen (Bag et al. 2014). Häufig sind die Auffälligkeiten verbunden mit den Zeichen einer mandibulären Unterentwicklung wie ein ausgeprägtes antegonial notching oder kaum ausgebildeten Rami mandibulae (Bag et al. 2014). Diese Veränderungen können zu einer Fehlstellung des Kondylus beziehungsweise der gesamten Mandibula führen (Bag et al. 2014) (Lukat et al. 2015).



Abb. 4: Klinisches Beispiel eines 16 Jahre alten, männlichen Patienten mit einer JIA aus der Poliklinik für Kieferorthopädie der Universitätsklinik Bonn
Fernröntgenseiten-Aufnahme (FRS), skelettal offene Schädelkonfiguration und mandibuläres Defizit in der Sagittal- und Vertikalebene



Abb. 5: Klinisches Beispiel eines 16 Jahre alten, männlichen Patienten mit einer JIA aus der Poliklinik für Kieferorthopädie der Universitätsklinik Bonn (Panoramaübersichtsaufnahme, OPT)
Verkürzte Rami mandibulae, resorbierte, abgeflachte Kondylen, ausgeprägtes antegonial notching

1.6 Rheumatoide Arthritis im Kniegelenk

Eine langjährige RA manifestiert sich in knapp 90 % der Fälle am Kniegelenk (Sculco 1998). Der progressive Verlauf führt zu erheblichen Schmerzen und geht mit Gelenksteifigkeit sowie ausgeprägter morphologischer Deformierung sowohl der Hart- als auch Weichgewebe einher (Sculco 1998). Entsprechend zeigen sich Achsenabweichungen im Sinne von Valgus-Varus-Deformitäten und einem Genu recurvatum, die zu Streckausfällen führen können (Trum 2009).

Sowohl die entzündliche Komponente, die zu einer ausgeprägten proliferativen Synovitis führen kann als auch die mechanische Destruktion des Kniegelenkes können zu einer deutlichen Patientenmorbidity führen, die oftmals mittels konservativen therapeutischen Maßnahmen nicht wirksam behandelt werden können (Sculco 1998). Dementsprechend werden dann chirurgische Maßnahmen, wie z.B. die arthroskopische Synovektomie oder das Anbringen eines künstlichen Kniegelenkersatzes, notwendig (Sculco 1998).

1.7 Das K/BxN Modell: Ein Arthritis Tiermodell

Da eine Krankheitsetablierungs- und Pathogenese bezogene Erforschung der RA am Patienten nur begrenzt möglich ist, wurden diverse Arthritis Tiermodelle entwickelt. Das K/BxN Arthritis Mausmodell wurde zufällig entdeckt und erstmals 1996 von Kouskoff et al. aus Straßburg vorgestellt (Kouskoff et al. 1996). Abbildung 6 zeigt schematisch die Beziehungen der beteiligten Mauslinien.

Durch die Kreuzung von den transgenen Mausstämmen KRN und NOD entsteht eine arthritische Generation von K/BxN Mäusen (Kouskoff et al. 1996). Die erste, KRN Mauslinie ist transgen für einen T-Zellrezeptor, der das Peptid der bovinen Pankreasribonuklease (RNase) im Kontext einer I-Ak Präsentation durch das Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II) erkennt (Kouskoff et al. 1996). Die zweite transgene NOD Mauslinie exprimiert ein MHC-II Molekül I-Ag7, welches zufälligerweise auch von den transgenen T-Zell-Rezeptoren der KRN Mauslinie erkannt wird (Kouskoff et al. 1996). Die Kreuzung dieser beiden Stämme resultiert in der K/BxN Mauslinie, welche nun autoimmun gegenüber dem ubiquitär vorkommenden Glucose-6-phosphat Isomerase-Peptid (GPI) reagiert, indem sie pathogene anti-GPI Autoantikörper

produziert (Kouskoff et al. 1996). Das Serum dieser Mäuse verursacht eine ähnliche Arthritis in einem breiten Spektrum von Mausstämmen – in diesem Fall in naiven Wildtypmäusen (Kouskoff et al. 1996). Dieses Modell ist geeignet für die Untersuchung der Entwicklung der Autoimmunität und insbesondere der Mechanismen, durch die Anti-GPI-Autoantikörper eine gelenkspezifische Entzündung auslösen (Serumtransfermodell) (Ditzel 2004) (Monach et al. 2007).

Für das K/BxN Modell sind die transgenen T-Zellrezeptoren und das MHC-II Molekül I-Ag7 von entscheidender Bedeutung (Kouskoff et al. 1996). Damit einher geht die Schlüsselrolle der CD4⁺ T-Lymphozyten (Kouskoff et al. 1996). Weitere Experimente konnten außerdem die Voraussetzung vom Vorhandensein reifer B-Zellkompartimente für die Entstehung einer Arthritis im K/BxN Modell aufzeigen (Ditzel 2004). Durch deren Blockade durch eine μ MTo Mutation wird ein Arthritisausbruch in K/BxN Mäusen verhindert (Kouskoff et al. 1996).

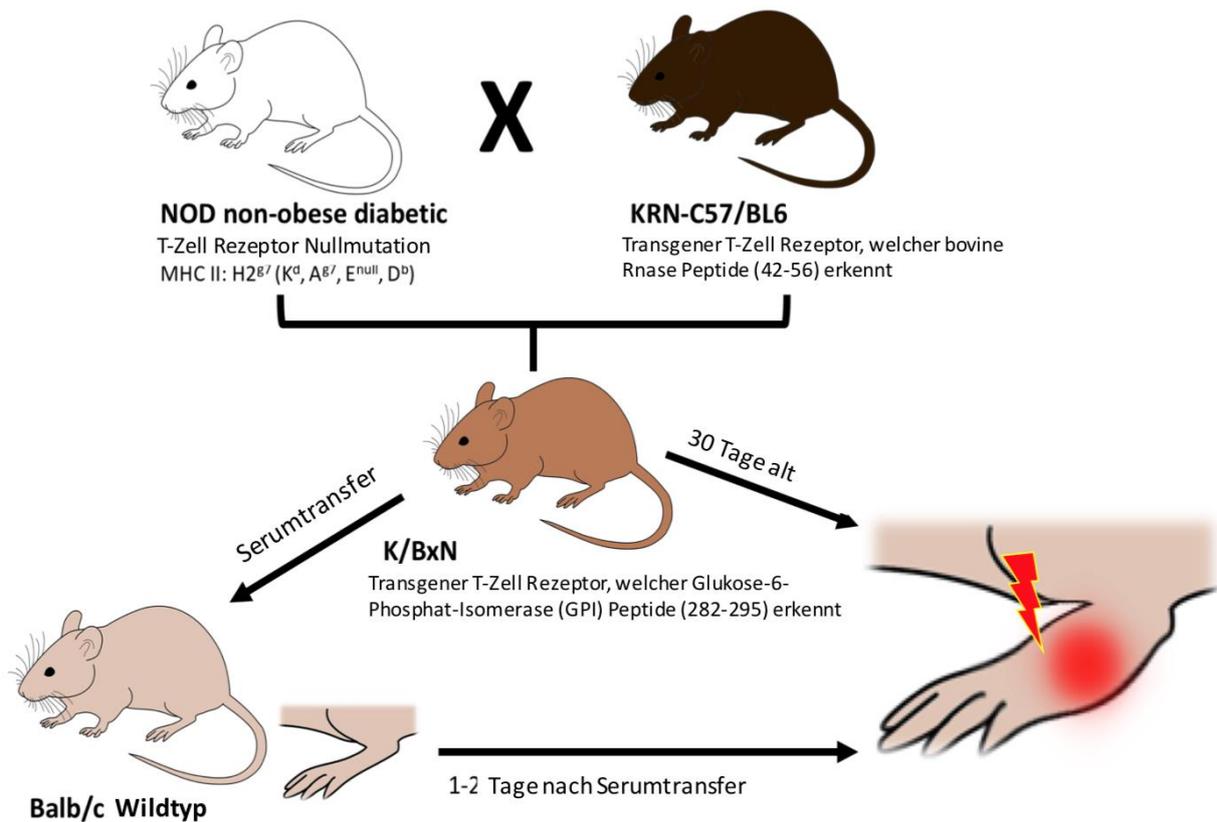


Abb. 6: K/BxN Mausmodell

Serum von arthritischen K/BxN-Mäusen, die durch Kreuzung von NOD- und KRN-Mäusen generiert wurden, diente zur Induktion einer experimentellen Arthritis. Wildtyp BALB/c Tiere erhielten im Alter von 20 Wochen 100 µl arthritogenes K/BxN Serum. 1-2 Tage nach dem Serumtransfer entwickelten die BALB/c-Mäuse selbst eine Arthritis mit entsprechenden klinischen Anzeichen einer Entzündung.

1.8 Fragestellung und Hypothese

Da die derzeit gängigen Präventions- und Behandlungsmethoden die Gelenksdestruktion nicht rückgängig machen können und darüber hinaus mit möglichen schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Leberschäden, Lungeninfektionen oder Diabetes verbunden sind, ist es wichtig, die Pathogenese, sowie mögliche protektive Faktoren der RA noch genauer zu verstehen, um eine frühzeitige Diagnose und effektivere Therapien zu ermöglichen (Ricks et al. 2013) (Ditzel 2004). Während Humanstudien nur den Krankheitsverlauf beschreiben können, ist an Tiermodellen eine

genaue Untersuchung der Ursache-Wirkungs-Beziehungen möglich (Ricks et al. 2013) (Sherlock et al. 2012).

Trotz des Erfolges des K/BxN Modelles ist uns keine Studie bekannt, welche die arthritischen Prozesse im Kiefergelenk untersucht und mit denen der Extremitätengelenke mit Hilfe dieses Tiermodells miteinander verglichen hat.

Unsere Nullhypothese besagt, dass es keinen Unterschied in Art und Ausprägungsgrad der durch das K/BxN Modell induzierten arthritischen Veränderungen der Extremitätengelenke im Vergleich zu den Kiefergelenken gibt.

Ziel dieser Studie war es, einerseits die histomorphologischen, immunhistochemischen und radiologischen Veränderungen des Kiefergelenks bei arthritischen Mäusen mit Hilfe des K/BxN-Modells aufzuklären und andererseits diese Ergebnisse mit den Befunden (klinisch, histologisch, immunhistochemisch) der Erkrankung an den Extremitätengelenken zu vergleichen.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Reagenzien

Eisenhämatoxin nach Weigert	10 ml Eisenhämatoxin A
	5 ml Eisenhämatoxin B
Pepsin, 0,4 %	0,02 g Pepsin
	5 ml 0,01 N HCl
Ponceau-Säurefuchsinlösung	0,5 Azophloxin
	100 ml Aqua dest.
	0,2 ml Eisessig mischen und filtrieren
TBS-Puffer:	9,0 g NaCl
	6,0 g Tris
	in 1000 ml Aqua dest. gelöst
TBS/BSA-Puffer	10 ml TBS-Puffer
(1 %- bzw. 4 %-ig)	0,1 g bzw. 0,4 g Serumalbumin vom Rind
0,1 bzw. 0,4 g Serumalbumin Rind	

2.2 Verwendete Chemikalien

3,3 Diaminobenzidin (DAB)	Pierce, Rockford, Irland
Alkohole (70 %-100 %)	Merck, Darmstadt, DE
Aqua dest.	Diaprax, Wesel, DE
Aquatex	Merck, Darmstadt, DE
Azophloxin	Waldeck, Münster, DE
Depex	Serra, Heidelberg, DE
Diäthylbarbitursäure	Merck, Darmstadt, DE
Dimethylformamid	Sigma, Taufkirchen, DE
EDTA	Calbiochem, Darmstadt, DE
Eosinlösung, 1 %-ig, wässrig	Merck, Darmstadt, DE
Formaldehydlösung 4 %	Merck, Darmstadt, DE
Hämatoxin n. Meyer	Merck, Darmstadt, DE
Eisen-III-Chlorid	Merck, Darmstadt, DE
Eisessig	Merck, Darmstadt, DE
Eosin gelblich	Merck, Darmstadt, DE
Formaldehydlsg., 4 %-ig	Merck, Darmstadt, DE
Formol, 40 %-ig	Merck, Darmstadt, DE
Lichtgrün	Merck, Darmstadt, DE
Mayer´s saures Hämaun	Merck, Darmstadt, DE
Methanol	AppliChem, Darmstadt, DE
Molybdätophosphorsäure	Merck, Darmstadt, DE
Na-Azetat	Merck, Darmstadt, DE
Naphtol-AS-Biphosphat	Sigma, Taufkirchen, DE
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, DE
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt, DE
Natriumnitrit- Lsg., 4 %- ig	Merck, Darmstadt, DE
Orange G	Waldeck, Münster, DE
Paraffin Histo-Comp	Vogel, Gießen, DE
Pararosanilin-HCl-Lsg., 4 %-ig	Merck, Darmstadt, DE

Pepsin	Merck, Darmstadt, DE
Perjodsäure 0,5 %-ig	Merck, Darmstadt, DE
Ponceau S	Merck, Darmstadt, DE
Salzsäure 2 mol/l	Merck, Darmstadt, DE
Säurefuchsin	Merck, Darmstadt, DE
TrisHCl Puffer	Merck, Darmstadt, DE
Weinsäure	Merck, Darmstadt, DE
Wasserstoffperoxid, 30 %-ig	Sigma, Taufkirchen, DE
Xylol	Merck, Darmstadt, DE
Xylolersatz XEM 2000	Vogel, Gießen, DE

2.3 Verwendete Geräte und Materialien

Analysewaage	Sartorius, Göttingen, DE
D Superfrost Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Deckgläser	Engelbrecht, Edermunde, DE
Einbettautomat V.I.P 2000/3000	Vogel, Gießen, DE
Elisa Platten	Greiner Bio-One, Österreich
ELISA Reader SpectraMAX 190	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Glasküvetten	Roth, Karlsruhe, DE
Lichtmikroskop Axioskop 2	Zeiss, Jena, DE
Mikroskopkamera AxioCam	Zeiss, Jena, DE
Mimics Software Version 18.0	Materialise, Leuven, Belgien
NRecon Software 1.51	Bruker, Kontich, Belgien
Paraffinausgießstation Tissue-Tek TEC	Sakura, Heppenheim, DE
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, DE
Rotationsmikrotom HM 355S	Microm International, Walldorf, DE
Wärmeplatte	Medax Nagel, Kiel, DE
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach, DE
µCT-Scanner 1174 der Marke SkyScan	Bruker, Kontich, Belgien

2.4 Übersicht der verwendeten Primärantikörper

Antikörper für	Art	Verdünnung
VEGF sc152	Polyklonal rabbit A-20	1:50
IL-17 sc7927	Polyklonal rabbit H-132	1:50
OPG sc8468	Polyklonal rabbit N20	1:50

Alle Antikörper wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA erworben.

2.5 Übersicht der verwendeten ELISA Kits

RANTES "Mouse CCL5/RANTES Duo Set" RnD Systems, Minneapolis, USA

TNF- α "Mouse TNF- α uncoated ELISA Kit" Invitrogen by Thermo Fisher Carlsbad, USA

2.6 Übersicht des zeitlichen Verlaufs der Versuche

Zeitlicher Ablauf der Versuche

Versuchstiere: n= 18 Alter 8-10 Wochen Kontrolltiere: n = 12 Alter 8-10 Wochen
Serumtransfer = Tag 0

Tag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	30	60	90	120			
Messung der Fortbewegung		Versuchstiere n = 18 Kontrolltiere n = 12							Versuchstiere n = 8 Kontrolltiere n = 6														
Messung der Gelenkschwellung (Extremitäten)		Versuchstiere n = 18 Kontrolltiere n = 12							Versuchstiere n = 8 Kontrolltiere n = 6														
Micro-CT Messung (Kiefergelenke)									Versuchstiere n = 10 Kontrolltiere n = 6														
Histologie (Extremitäten- und Kiefergelenke)																	Versuchstiere n = 10 Kontrolltiere n = 6						
Immunhistochemie (Extremitäten- und Kiefergelenke)																	Versuchstiere n = 10 Kontrolltiere n = 6						
ELISA			Versuchstiere n = 3 Kontrolltiere n = 3																				

Abb.7: Übersicht des zeitlichen Verlaufs der Versuche mit entsprechenden Versuchstierzahlen

2.7 Mausmodell:

Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, Köln, Deutschland, (AZ 84-02.04.2014.A287) genehmigt und gemäß der EU-Richtlinie 2010/63/UE durchgeführt. Die experimentelle Arthritis wurde mit der obigen Methode von Kouskoff et al. induziert. Zusammengefasst, wird das Serum von arthritischen K/BxN-Mäusen, das durch Kreuzen des Stammes für NOD und KRN erzeugt wurde, durch faziale venöse Blutentnahme gewonnen. Alle NOD-, KRN- und K/BxN-Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen in individuell belüfteten Käfigen in der Tierhaltung der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg mit 12 Std. Hell-Dunkel-Zyklus, Wasser und Futter *ad libitum* gezüchtet und untergebracht. Experimente wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP), Universitätsklinikum Bonn, durchgeführt und Versuchstiere in der Tierklinik des IMMIP, Universitätsklinikum Bonn, in individuell belüfteten Käfigen in einem 12 Std. Dunkel-/Lichtzyklus mit Zugang zu Nahrung und Wasser *ad libitum* gehalten. Wildtyp BALB/c-Mäuse (n=18) erhielten im Alter von 20 Wochen 100 µl das arthritogene K/BxN-Serum durch intraperitoneale Injektion. Eine zweite Gruppe ohne Seruminjektion diente als Kontrollgruppe (n=12). Der Tag der Seruminjektion wird als Tag 0 bezeichnet.

2.8 Messungen der Gelenksschwellung

Zur Beurteilung der Sprung- und Kniegelenksschwellung wurde der Knöcheldurchmesser der Versuchstiere (n=18), sowie der Kontrolltiere (n=12) aller vier Extremitäten mit einem Mikrometer gemessen (Hahn + Kolb, Modell-Nr. 33185). Die Hinterpfote wurde vom lateralen bis zum medialen Knöchel gemessen. Der palmar-dorsale Durchmesser wurde für die Vorderpfote bestimmt. Die Werte wurden mit denen vor der Arthritisinduktion und der Kontrollgruppe verglichen.

2.9 Messungen der Fortbewegung

Die Beurteilung der horizontalen Fortbewegung wurde nach der Methode von Frommholz et al. bewertet (Frommholz et al. 2012). Die Versuchstiere (n=18) und die Kontrolltiere (n=12) durchliefen eine Anpassungsphase von 5 Minuten und wurden dann für 10 Minuten aufgenommen. Die eigentliche Bewegungsverfolgung erfolgte mit

SwissTrack (École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Schweiz). Wieder wurden diese Werte mit denen vor der Arthritisinduktion und der Kontrollgruppe verglichen.

2.10 Präparation

Nach erfolgter Äthernarkose wurden 10 Versuchstiere, sowie 6 Kontrolltiere durch zervikale Dislokation getötet. Die studienrelevanten Köpfe und unteren Extremitäten wurden vom Rest des Körpers abgetrennt und in 4 %-iger gepufferter Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden die Schädel medial-sagittal halbiert und die knöchernen Strukturen distal und proximal zum Kniegelenk beziehungsweise Sprunggelenk so weit wie möglich entfernt.

2.11 Fixierung

Die präparierten Gelenke (Knie-, Sprunggelenke, Kiefergelenke) wurden in 4 % phosphatgepuffertem Formaldehyd für 24 bis 48 Std. fixiert.

2.12 Mikro-Computertomographie (μ CT)

Da eine Schwellung im Kiefergelenk nicht beobachtet werden konnte, erfolgte die Analyse dieser Gelenke im Hinblick auf Morphologie und Anzeichen von Knochenzerstörungen mit Hilfe der μ CT-Bildgebung (am 8. Tag gemessen). An diesem Tag wurden die maximalen Anzeichen einer klinischen Entzündung in den Extremitätengelenken beobachtet. Die Präparate (Versuchstiere n=10 Kontrolltiere n=6) wurden mit dem μ CT-Scanner 1174 der Marke SkyScan geröntgt. Dieser Scanner wurde zur dreidimensionalen Untersuchung von unterschiedlichsten Materialien (Knochen, Kunststoff, Metall, Gestein usw.) entwickelt. Durch die Möglichkeit, die Pixelgröße bis auf 6 μ m zu verfeinern, können Objekte sehr detailgenau rekonstruiert werden. Das volumetrische Rekonstruktionsprogramm NRecon (NRecon, Version 1.51, Skyscan, Kontich, Belgien) erstellte dann die virtuellen Schnitte der Probe, die dann in das DICOM-Format (Digital Imaging and Communications in Medicine) umgewandelt wurden. Die Daten im DICOM-Format wurden dann in die medizinische Bildverarbeitungssoftware Mimics (Version 18.0, Materialise, Leuven, Belgien) importiert. Der Mausschädel wurde halbautomatisch mit Hilfe eines globalen

Schwelweralgorithmus abgegrenzt. Nach der Bestimmung der interessierenden Region wurden die Kondylen in ihrer dreidimensionalen Morphologie untersucht und mit der Kontrollgruppe verglichen (siehe Abbildung 8).

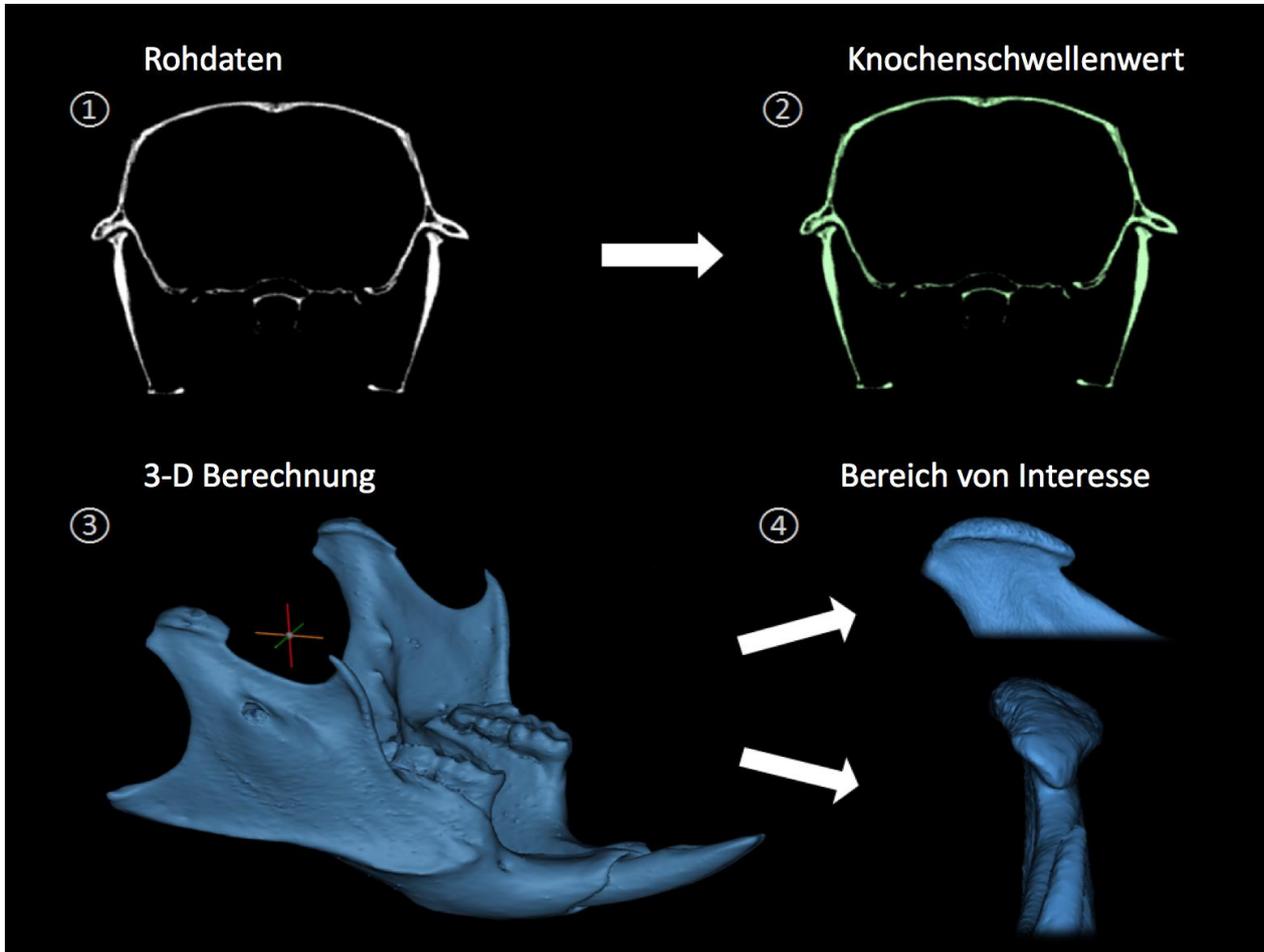


Abb. 8: Workflow zur dreidimensionalen Rekonstruktion der Kiefergelenke

2.13 Histologie

Histologische Untersuchungen wurden an 10 Versuchstieren, sowie 6 Kontrolltieren am 8. Tag nach Arthritisinduktion durchgeführt, da hier das Maximum der klinischen Entzündung nachweisbar war.

2.13.1 Entkalkung

Das Gewebe wurde in 10 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) für 12 Wochen entkalkt, wobei die Entkalkungslösung wöchentlich gewechselt wurde, bis eine Trübung

der Flüssigkeit ausblieb. Im Anschluss erfolgte die Wässerung der Präparate für 6 Stunden.

2.13.2 Dehydrierung und Einbettung

Im Gewebeentwässerungs- und Einbettautomaten Tissue-Tek V.I.P. 2000/3000 der Marke Vogel (Gießen) erfolgte die Dehydrierung und Einbettung in aufeinander folgenden Schritten. Nach einer zweistündigen Wässerung wurden die Präparate unter Verwendung der unten aufgeführten aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und schließlich paraffiniert:

1. 70 %-iger Alkohol	40°C	1 Std.
2. 70 %-iger Alkohol	40°C	1 Std.
3. 80 %-iger Alkohol	40°C	1 Std.
4. 96 %-iger Alkohol	40°C	1 Std.
5. 96 %-iger Alkohol	40°C	1 Std.
6. 100 %-iger Alkohol	40°C	75 Min.
7. 100 %-iger Alkohol	40°C	75 Min.
8. 100 %-iger Alkohol	40°C	75 Min.
9. Xylol	40°C	1 Std.
10. Xylol	40°C	75 Min.
11. Paraffin	60°C	1 Std.
12. Paraffin	60°C	1 Std.
13. Paraffin	60°C	1 Std.
14. Paraffin	60°C	1 Std.

Nach der Platzierung der Präparate mit der sagittalen Schnittebene nach oben in speziellen Kunststoffküvetten erfolgte die Einbettung mit Hilfe der Paraffinausgießstation Tissue-Tek TEC der Firma Sakura, Heppenheim.

2.13.3 Schnitthanfertigung

Am Rotationsmikrotom HM 355 S Microm International der Firma Thermo Fisher Scientific (Walldorf, Deutschland) wurden die zuvor gekühlten Präparate in 3 µm dicke

Schnitte geschnitten und auf einzelnen Objektträgern in der Ausführung Superfrost Plus der Firma Merzel, Braunschweig platziert. Nach Trocknung auf einer 42°C warmen Wärmeplatte für 10 Minuten wurden die Schnitte im Anschluss für weitere 24 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank gelagert.

2.13.4 Entparaffinierung

Im Zuge der Vorbereitung für die Übersichts- und immunhistochemischen Färbungen wurden die Schnittpräparate manuell anhand der unten aufgeführten Beschreibung entparaffiniert:

1. Xylolersatz	10 Min.
2. Xylolersatz	10 Min.
3. 100 %-iger Alkohol	5 Min.
4. 100 %-iger Alkohol	5 Min.
5. 96 %-iger Alkohol	5 Min.
6. 70 %-iger Alkohol	5 Min.
7. Aqua dest.	10 Min.

2.13.5 Übersichtsfärbung: Hämatoxylin-Eosin-(HE)

Nach der oben genannten Entparaffinierung erfolgten 5 Übersichtsfärbungen pro Probe (n=10 Versuchstiere; n=6 Kontrolltiere) in Hämatoxylin-Eosin manuell unter folgendem Protokoll:

1. Mayers Hämalaunlösung	30 Sek.
2. Spülen unter fließendem Leitungswasser	4 Min.
3. Eosinlösung	2 Min.
4. Schwenken in Aqua dest.	5 Min.
5. 70 %-iger Alkohol	1 Min.
6. 96 %-iger Alkohol	1 Min.
7. 100 %-iger Alkohol	2 Min.
8. 100 %-iger Alkohol	2 Min.
9. Xylolersatz	2 Min.

10. Xylolersatz 2 Min.
 11. Eindecken mit DePex

2.14 Immunhistochemie

Zum spezifischen Nachweis verschiedener inflammatorischer Signalmoleküle wurden immunhistochemische Färbungen für VEGF (Vascular endothelial growth factor), IL (Interleukin) -17, sowie OPG (Osteoprotegerin) an Präparaten von 10 Versuchstieren, sowie von 6 Kontrolltieren durchgeführt.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde wie oben beschrieben die Entparaffinierung an 5 Abschnitten pro Probe durchgeführt und nach folgender Arbeitsweise für die einzelnen Antikörper durchgeführt:

2.14.1 Protokoll der immunhistochemischen Färbungen

- | | |
|--|--------------------|
| 1. Blockieren der endogene Peroxidase
70mlMethanol/700 µl 30 %-ige H ₂ O ₂ -Lösung
(Merck, Darmstadt, DE) | 20 Min. im dunkeln |
| 2. Rehydratation und Spülen in
tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) | 10 Min. |
| 3. Vorverdauung in 0,4 % Pepsin | 20 Min. bei 37°C |
| 4. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 5. Vorinkubation in 4 % TBS/BSA (Rinderserumalbumin) | 1 Std. |
| 6. Inkubation des Primärantikörpers (VEGF/IL-17/OPG)
in 1:50 Verdünnung mit 1 %-igem TBS/BSA
Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA | Über Nacht bei 4°C |
| 7. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 8. Inkubation mit dem Sekundärantikörper
Dako EnVision anti rabbit, HRP konjugiert
(DAKO, Glostrup, Dänemark) | 30 Min. |
| 9. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 10. Färbung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) 1:30 | 5-8 Min. |
| 11. Spülen in TBS | 10 Min. |

12. Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun	1 Sek.
13. Bläuen unter fließendem Wasser	4 Min.
14. Dehydrierung	
14.1. 70 %-iger Alkohol	2 Min.
14.2. 96 %-iger Alkohol	2 Min.
14.3. 100 %-iger Alkohol	2 Min.
14.4. 100 %-iger Alkohol	2 Min.
14.5. Xylolersatz	2 Min.
14.6. Xylolersatz	2 Min.
15. Eindecken mit DePex	

Zur Verifizierung der verwendeten Marker wurden die immunhistochemischen Färbungen jeweils durch Positiv- und Negativkontrollen getestet.

Für die Positivkontrollen wurden Schnitte von vorherigen altersentsprechenden Kontroll-Wildtypmäusen, mit bekannten positiven immunhistochemische Reaktionen beim Einsatz der Primärantikörper verwendet.

Für die Negativkontrollen zur Bestimmung der Spezifität der Immunreaktion wurde der Primärantikörper durch eine nicht reagierende Substanz (TBS/BSA) ersetzt.

2.15 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Zur Bestimmung der systemischen Zytokinkonzentrationen von TNF- α und RANTES wurden Serumproben mittels ELISA untersucht. Die Serumgewinnung erfolgte an den Tagen 3 bis 8 nach Serumtransfer durch faziale venöse Blutentnahme an arthritischen Mäusen (n=3), sowie an Kontrollmäusen (n=3). Die Farbintensität wurde anschließend photometrisch anhand eines ELISA-Readers ermittelt, wobei die Stärke der Farbreaktion mit der Konzentration des untersuchten Zytokins korrelierte.

2.15.1 ELISA Protokoll

1. Beschichtung der ELISA-Platten mit dem primären Antikörper und Verdünnung in PBS	2 Min.
2. Inkubation	über Nacht bei 4°C

3. Waschen der ELISA Platten mit (400 µL) Waschpuffer (PBS/0,05 % Tween20, Sigma-Aldrich)
4. Blockieren der ELISA Platten durch Zugabe von 300 µL Reagenz Diluent 1 Std. bei RT
5. 100 µl Probe in Reagenzverdünnungsmittel verdünnen und inkubieren 2 Std. bei RT
6. Waschen der ELISA Platten mit (400 µL) Waschpuffer (PBS/0,05 % Tween20, Sigma-Aldrich)
7. Applikation des Detektionsantikörpers und Inkubation 2 Std RT
8. Waschen der ELISA Platten mit (400 µL) Waschpuffer (PBS/0,05 % Tween20, Sigma-Aldrich)
9. Applikation des Meerrettichperoxids (HRP) Streptavidin 20 Min. bei RT
10. Waschen der ELISA Platten mit (400 µL) Waschpuffer (PBS/0,05 % Tween20, Sigma-Aldrich)
11. Applikation des Substrats Tetramethylenbenzidin (TMB) 20Min. bei RT
12. Zugabe der Stopp Solution und sofortige Messung der optischen Dichte bei 45 nm mit dem ELISA Reader SpectraMAX 190

2.16 Auswertung und fotografische Dokumentation

Die Gelenkmorphologie wurde an den Übersichtsfärbungen (Versuchspräparate n=10 Kontrollpräparate n=6; 5 Abschnitte pro Probe) im Durchlichtmikroskop Axiokop 2 der Firma Zeiss (Jena) auf Ödeme und Entzündungszeichen wie Synovialzellhyperplasie und Zellinfiltration untersucht. Auch die histologische Schichtung des Gewebes wurde auf Anzeichen einer Knorpelzerstörung oder Knochenerosion untersucht. Die Analysen der Immunreaktionen erfolgten anhand eines semiquantitativen Scores nach folgender Einteilung:

Tab. 1: Semiquantitativer Score zur Analyse der Immunreaktion

-	Keine Reaktion
+ -	Schwache Reaktion
+	Mittelstarke Reaktion
+ +	Starke Reaktion

Die fotografische Dokumentation erfolgte mit der AxioCam MRc Kamera, sowie der AxioVision Rel. 4.5" Software, jeweils von der Firma Zeiss (Jena).

Für die Auswertung wurden fünf repräsentative Präparate pro Gruppe herangezogen.

2.17 Statistische Auswertung

Mit Hilfe des Mann-Whitney U-Test wurden Unterschiede zwischen zwei ungepaarten Gruppen mit nicht-parametrischer Verteilung auf statistische Signifikanz getestet. Mittelwerte und Standardfehler der Mittel wurden für Pfortenschwellung und Bewegungsaktivität ermittelt. Ausreißer wurden mit der ROUT-Methode identifiziert. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ gesetzt. Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla California USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Gelenkschwellung

Im Vergleich zur Kontrollgruppe und zum Zeitpunkt vor der Arthritisinduktion nahm die Gelenkschwellung bis zum vierten Tag stetig zu und fiel ab dem achten Tag wieder ab. Der beobachtete Unterschied erwies sich als statistisch signifikant vom zweiten ($p = < 0,05$) bis zum neunten Tag nach dem Serumtransfer ($p = < 0,0001$; siehe Abb. 9 und 10). Die maximale Schwellung wurde an den Tagen 4-8 beobachtet.

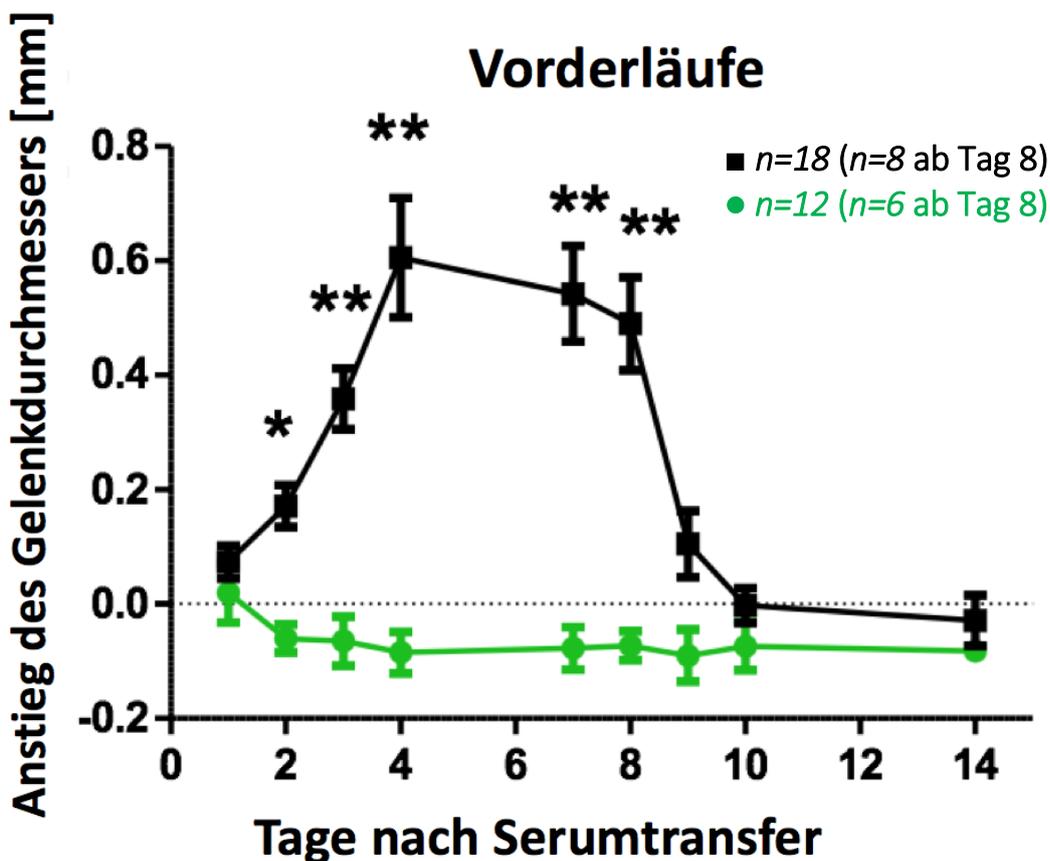


Abb. 9: Knöcheldicke der Vorderläufe der Arthritis-induzierten BALB/c-Mäuse (n=18 bzw. 8) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=12 bzw. 6)

Der Durchmesser jeder Pfote wurde mit einem Calipermeter gemessen und die Größe des Gelenks vor der Arthritisinduktion wurde ebenfalls von diesen Werten für jede Maus abgezogen. BALB/c-Mäuse ohne (●) und mit (■) Arthritis-induziert. Die statistische Signifikanz wird durch Sterne (ns = nicht signifikant, * für $p < 0,05$, ** für $p < .01$, *** für $p < 0,001$, **** für $p < 0,0001$) angegeben. Die Werte werden mit SEM als Mittelwert angegeben.

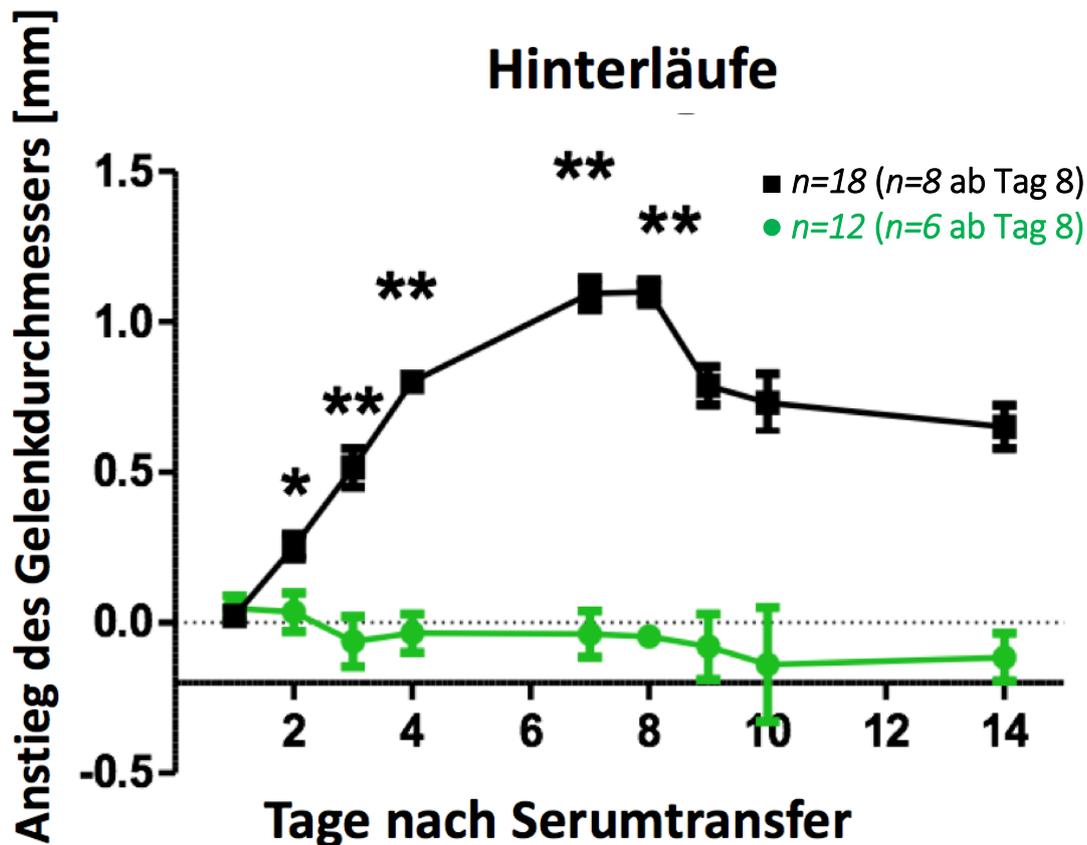


Abb. 10: Knöcheldicke der Hinterläufe der Arthritis-induzierten BALB/c-Mäuse (n=18 bzw. 8) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=12 bzw. 6)

Der Durchmesser jeder Pfote wurde mit einem Calipermeter gemessen und die Größe des Gelenks vor der Arthritisinduktion wurde ebenfalls von diesen Werten für jede Maus abgezogen. BALB/c-Mäuse ohne (●) und mit (■) Arthritis-induziert. Die statistische Signifikanz wird durch Sterne (ns = nicht signifikant, * für $p < 0,05$, ** für $p < .01$, *** für $p < 0,001$, **** für $p < 0,0001$) angegeben. Die Werte werden mit SEM als Mittelwert angegeben.

3.2 Fortbewegung

Die Analyse der horizontalen Bewegungsaktivität von Arthritis-induziert BALB/c-Mäusen ergab einen signifikanten Rückgang im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Bewegungsaktivität vor dem Serumtransfer nach 2 ($p = < 0,01$) und nach 4 Tagen ($p = < 0,05$; siehe Abb. 11). Die geringste Fortbewegungsaktivität wurde am Tag 3 beobachtet.

Maus Bewegungsaktivität

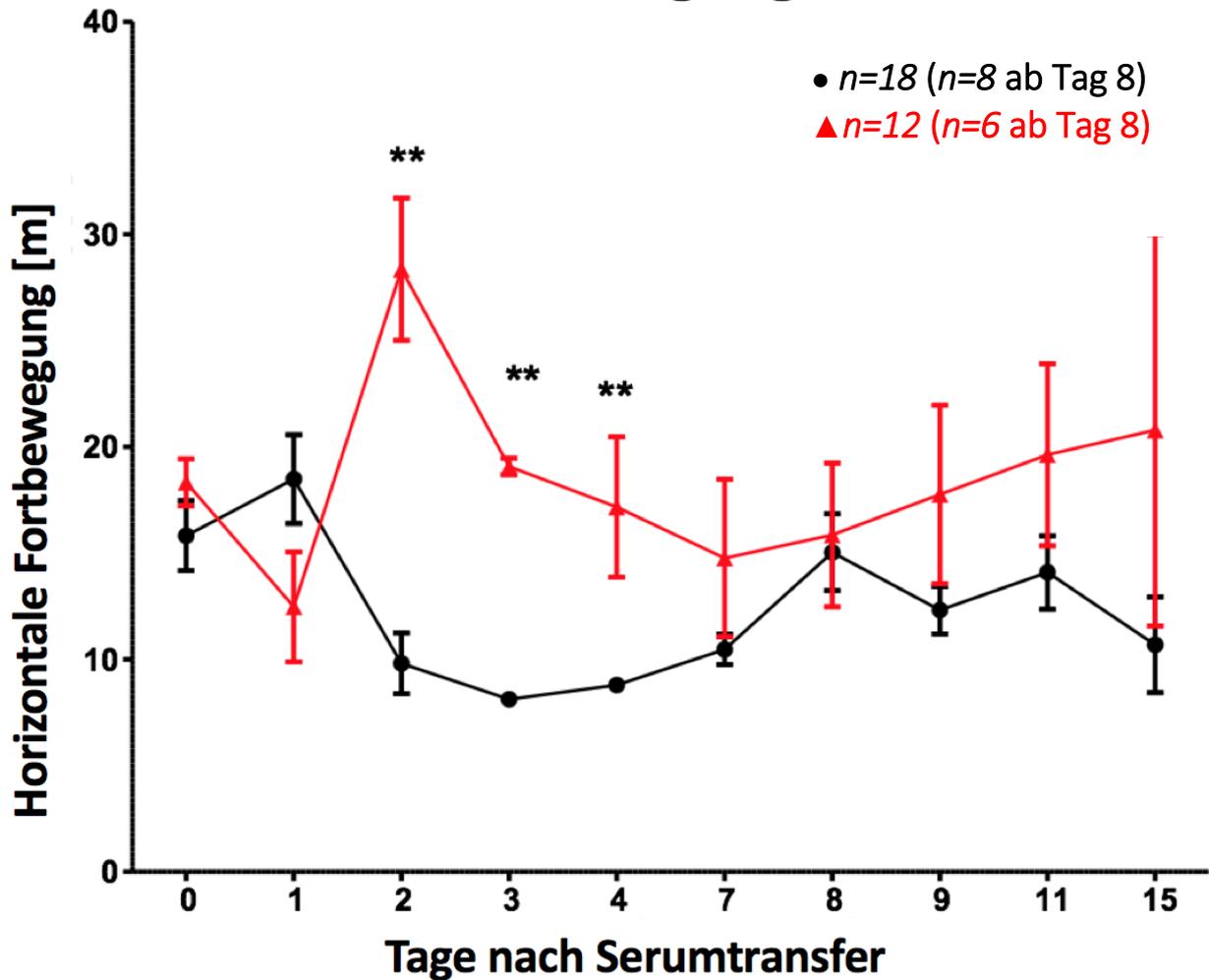


Abb. 11: Bewegungsaktivität der Arthritis-induzierten BALB/c-Mäuse ($n=18$ bzw. 8) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n=12$ bzw. 6) über einen Zeitraum von 15 Tagen

BALB/c-Mäuse ohne (▲) und (●) Arthritis-Induktion. Die statistische Signifikanz wird durch Sterne angezeigt (ns = nicht signifikant, * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$).

3.3 Mikro-CT (μ CT)

Die Analyse der Kiefergelenkmorphologie mittels μ CT ergab, dass weder im Kiefergelenk der arthritischen Gruppe noch bei den Kontrollen Hinweise auf Knochenabbau wie Abflachung, Erosionen, Osteophyten oder Sklerose des kortikalen Knochens vorhanden waren. Abbildung 12 zeigt ein typisches Bild der vorgefundenen physiologisch konvexen Kondylenform mit regelrecht glatter Knochenoberfläche in beiden Versuchsgruppen. Es sind keine erkennbare Einbrüche oder Unregelmäßigkeiten in der Struktur des Knochens zu erkennen.

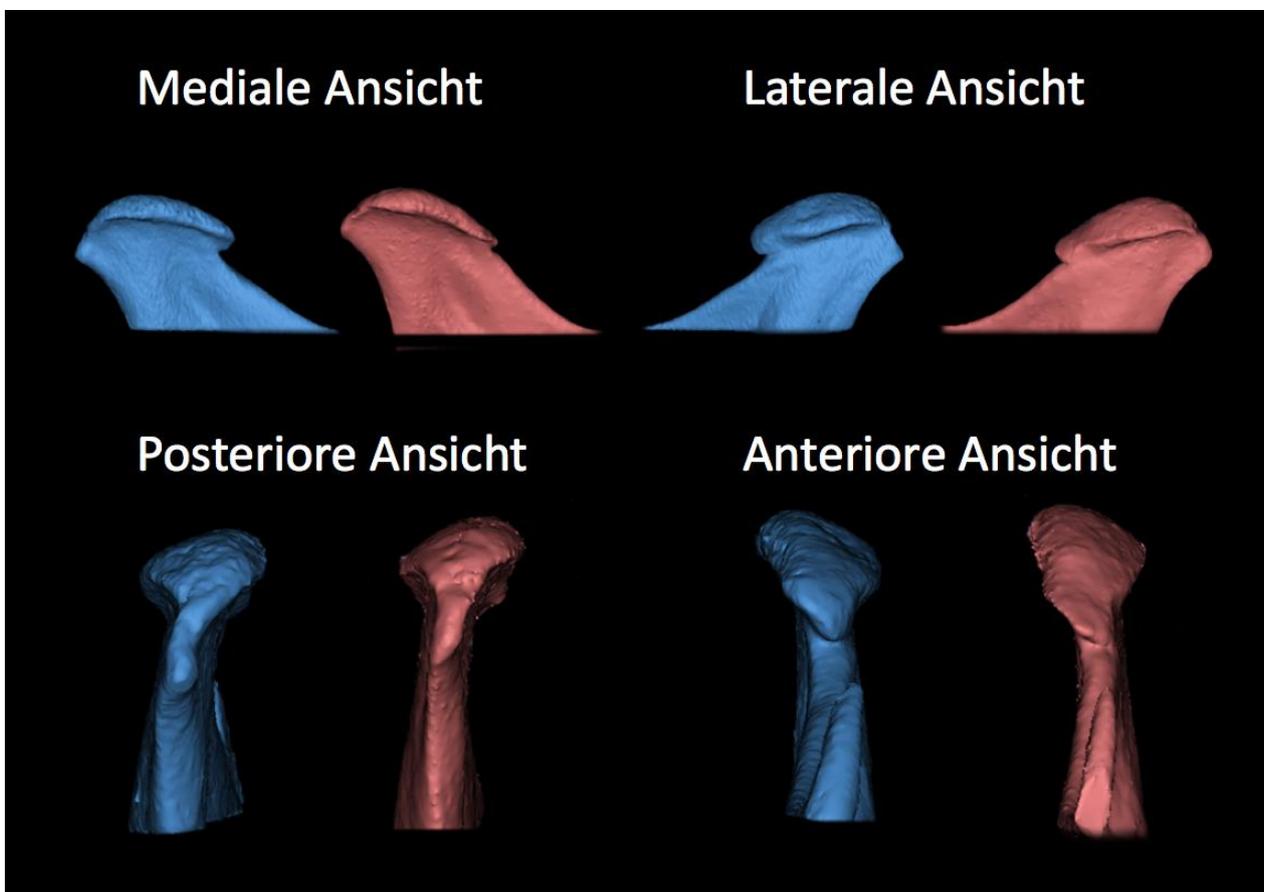


Abb. 12: Representative 3D- μ CT-Aufnahme des Unterkieferkondylus.
Physiologische Gelenkmorphologie; Keine Hinweise auf Knochendestruktion wie Abflachung, Erosionen, Osteophyten oder Sklerose.
Blau: Kontrolle Rot: Kiefergelenk nach Arthritisinduktion

3.4 Histologie

Die histologischen Auswertungen der Extremitätengelenke in der Kontrollgruppe zeigten eine physiologische Struktur in Schichtung und Morphologie (siehe Abbildung 13a). Die arthritischen Präparate der Extremitätengelenke zeigten hingegen deutliche Entzündungszeichen mit Verlust der physiologischen histologischen Schichtung, ausgedehnten subchondralen Osteolysen, sowie Degeneration von Knorpelgewebe. Ebenso nachweisbar ist eine Zunahme von Immunzellen und eine zusätzliche Vaskularisation. Eine Entzündungsreaktion war außerdem im umliegenden Muskelgewebe erkennbar. Gelegentlich war der Gelenkspalt kaum sichtbar (siehe Abbildung 13b).

Im Gegensatz dazu ergab die Untersuchung des Kiefergelenks keine Hinweise auf entzündliche Prozesse, weder bei den Kontrollmäusen noch bei den arthritischen Mäusen. Die charakteristische histologische Schichtung (oberflächliche, fibröse Bindegewebszone, Proliferationszone, Faserknorpelzone, enchondrale Ossifikationszone) war in beiden Gruppen nachweisbar (siehe Abbildung 14).

3.5 Immunhistochemie

Tabelle 2 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung. Die Immunhistochemie der Extremitätengelenke zeigte eine starke Expression (++) von VEGF bei den arthritischen Tieren als Zeichen einer erhöhten Vaskularisation. (siehe Abbildung 15). Im Vergleich dazu war keine (-) VEGF-Anreicherung in den Präparaten der Kontrollgruppe detektierbar. Zusätzlich wurde in den Präparaten der arthritischen Mäuse eine erhöhte Expression (++) des Entzündungsmarkers IL-17 beobachtet im Vergleich zur Kontrollgruppe (+-) (siehe Abbildung 16).

Für das OPG fanden wir in den Präparaten der arthritischen Gruppe eine verminderte Expression (+-) von OPG, die vor allem bei hypertrophen Chondrozyten auftrat. Im Vergleich dazu zeigte sich eine physiologische Expression von OPG in den Kontrollpräparaten der Extremitäten (+) (siehe Abbildung 17).

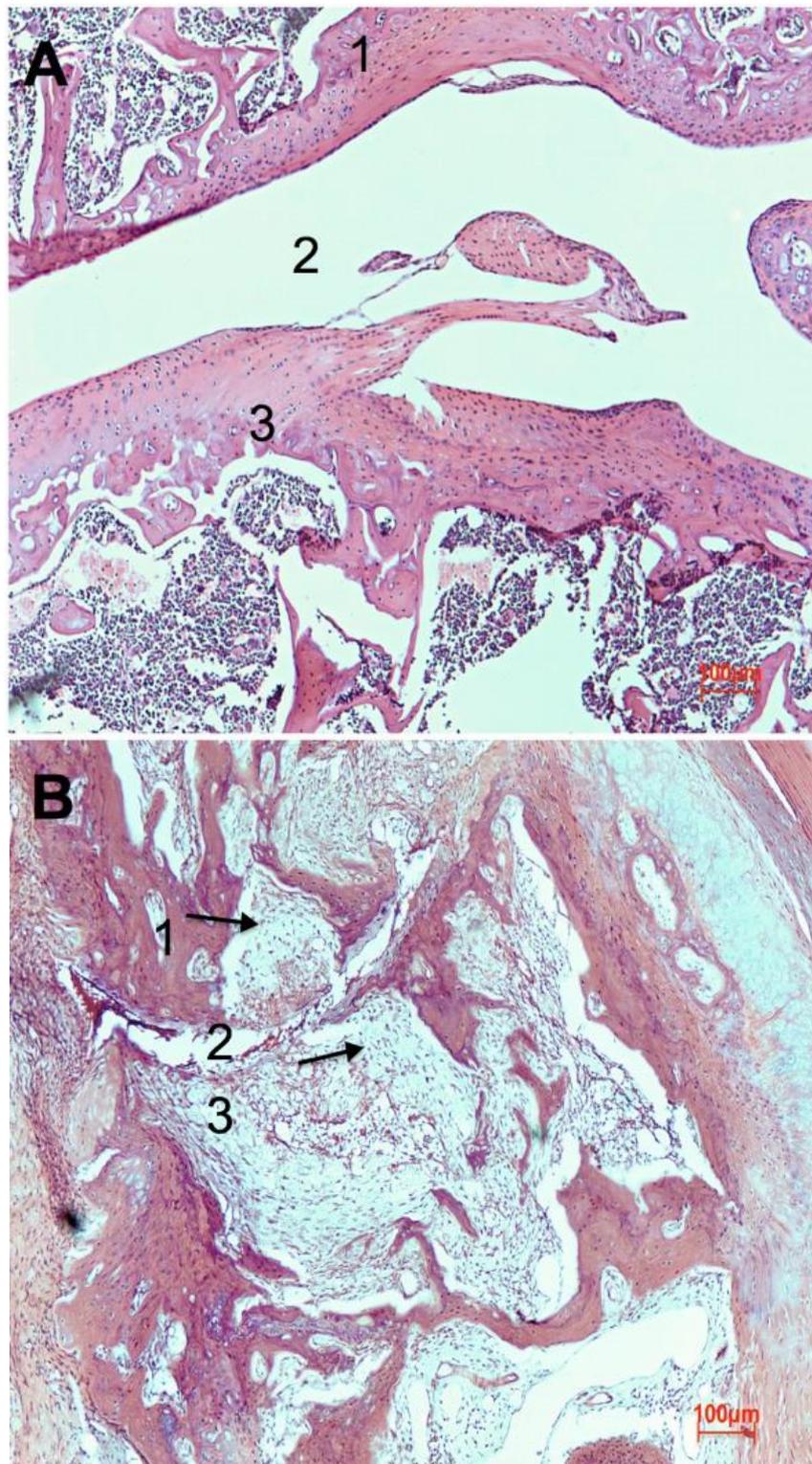


Abb. 13: Representative histologische Schnitte des Kniegelenks (10x). H&E-Färbung
 1: Femur 2: Gelenkspalt 3: Tibia

A: Gesundes Kniegelenk (Kontrolle)

B: Kniegelenk nach Arthritisinduktion am Tag 8. Fortgeschrittener Entzündungsprozess; Kaum sichtbarer Gelenkspalt, subchondrale massive Osteolyse (Pfeile), degenerativer Knorpel; Entzündungsreaktion im umgebenden Muskelgewebe.

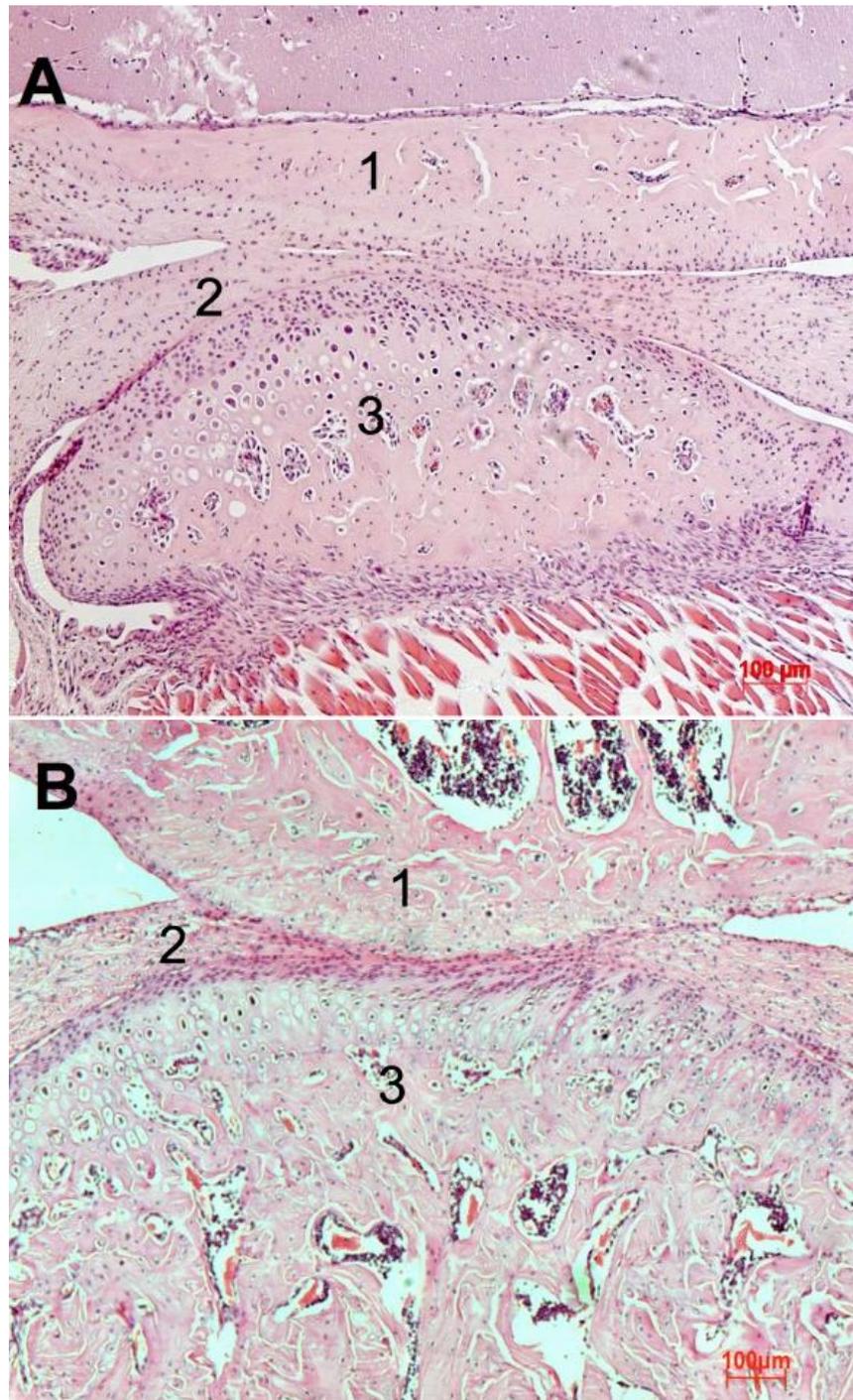


Abb. 14: Representative histologische Schnitte des Kiefergelenks (10x). H&E-Färbung
 1: Fossa mandibularis 2: Diskus articularis 3: Caput mandibulae
 A: Gesundes Kiefergelenk mit charakteristischer Schichtung
 B: Kiefergelenk nach Arthritisinduktion; physiologische Schichtung, kein Entzündungsprozess nachweisbar

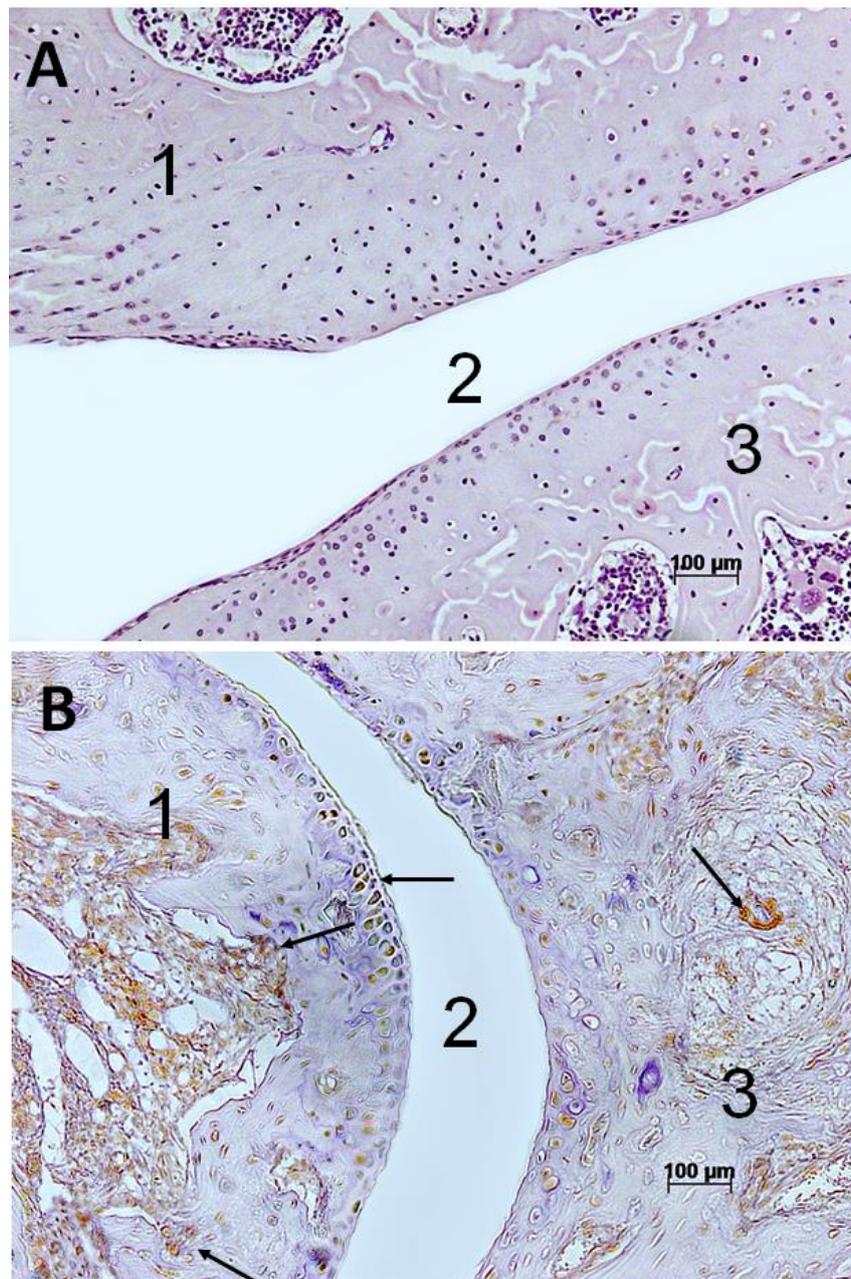


Abb. 15: Representative histologische Schnitte des Kniegelenks (20x).
Immunohistochemische Färbung mittels Antikörper gegen den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

1: Femur 2: Gelenkspalt 3: Tibia

A: Gesundes Kniegelenk (Kontrolle)

B: Kniegelenk nach Arthritisinduktion; Ubiquitäre Anhäufung von VEGF (Pfeile) als Hinweis auf eine Entzündung mit erhöhter Vaskularisation

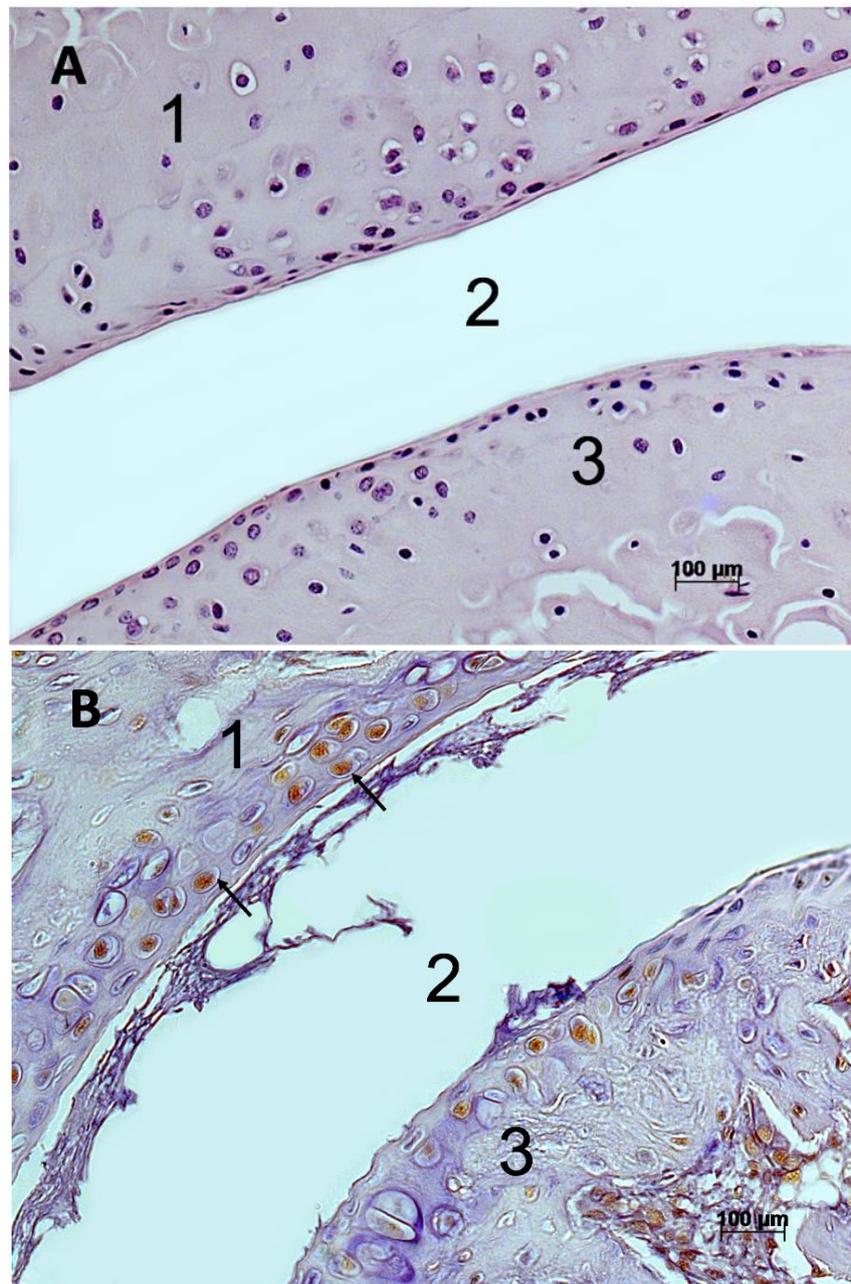


Abb. 16: Representative histologische Schnitte des Kniegelenks (20x).
 Immunohistochemische Färbung mittels Antikörper gegen Interleukin-17 (IL-17)
 1: Femur 2: Gelenkspalt 3: Tibia
 A: Gesundes Kniegelenk (Kontrolle)
 B: Kniegelenk nach Arthritisinduktion; erhöhte Akkumulation von IL-17 (Pfeile)

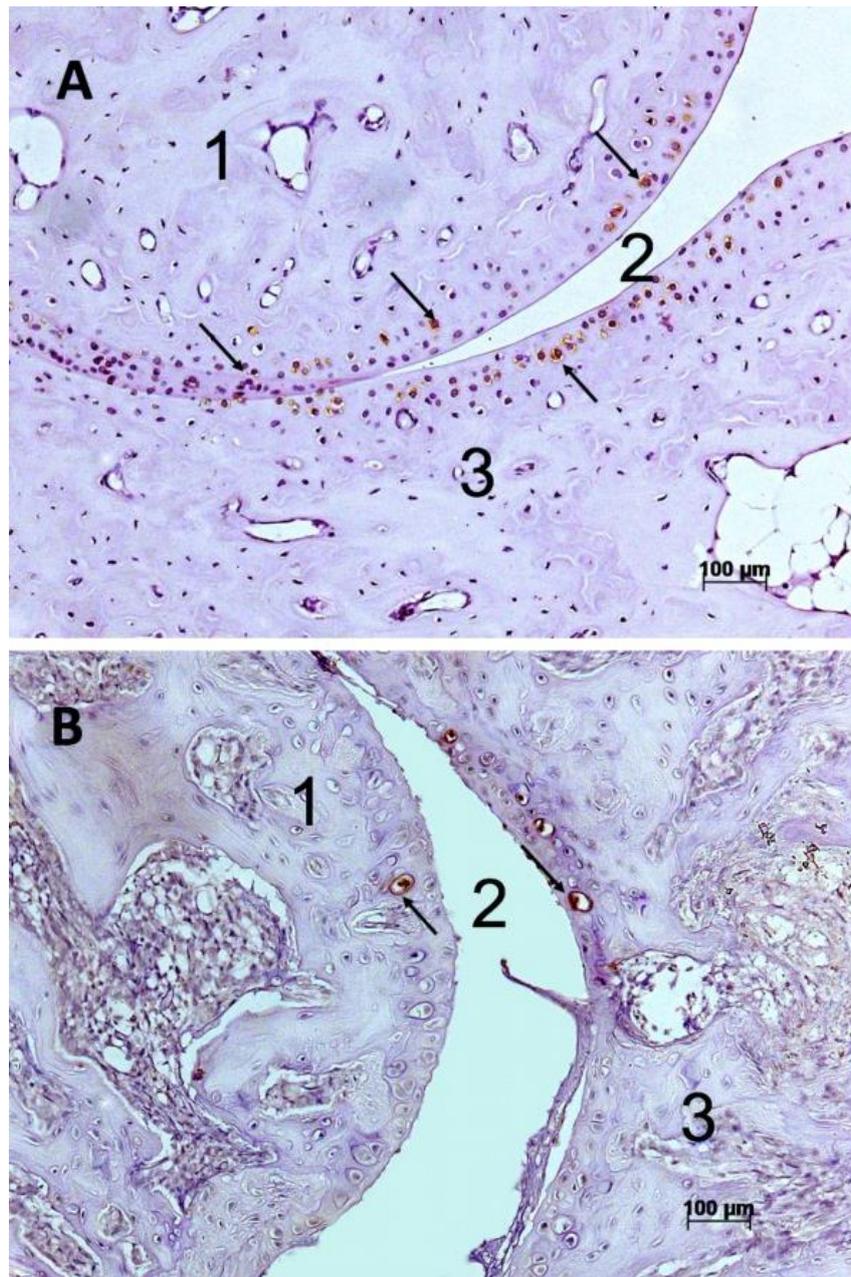


Abb. 17: Representative histologische Schnitte des Kniegelenks (20x).

Immunohistochemische Färbung mittels Antikörper gegen Osteoprotegerin (OPG)

1: Femur 2: Gelenkspalt 3: Tibia

A: Gesundes Kniegelenk (Kontrolle) Ubiquitäres Auftreten von OPG (Pfeile) in der Knorpelschicht und dem subchondralen Knochen

B: Kniegelenk nach Arthritisinduktion; Verminderte Anhäufung von OPG, vorrangig in hypertrophen Chondrozyten (Pfeile)

Für das Kiefergelenk konnten wir keine Unterschiede zwischen den Konzentrationen der gleichen Marker im Vergleich zu den Kontrollen feststellen. Die Anreicherung der unterschiedlichen Antikörper zeigte keine Veränderung zwischen der Arthritischen Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 2).

Tab. 2: Immunreaktionen der Knie- und Kiefergelenke im Vergleich zwischen der Arthritischen Gruppe (n=10) und der Kontrollgruppe (n=6)

	VEGF	IL-17	OPG
Kniegelenk Arthritis n=10	++	++	+-
Kniegelenk Kontrolle n=6	-	+	+
Kiefergelenk Arthritis n=10	-	+-	+
Kiefergelenk Kontrolle n=6	-	+-	+

3.6 ELISA Daten

Die Serum Zytokinkonzentrationsmessungen mittels ELISA konnten eine eindeutige systemische Inflammation bei den arthritischen Mäusen nachweisen. So betrug die TNF- α Konzentration in dieser Gruppe durchschnittlich 20 pg/ml (siehe Abb. 18). Des Weiteren betrug an Tag 3 die RANTES Konzentration in den erkrankten Mäusen 38 pg/ml und an Tag 8 35 pg/ml (siehe Abb.19). Im Gegensatz dazu konnte in den Kontrolltieren systemisch weder TNF- α noch RANTES nachgewiesen.

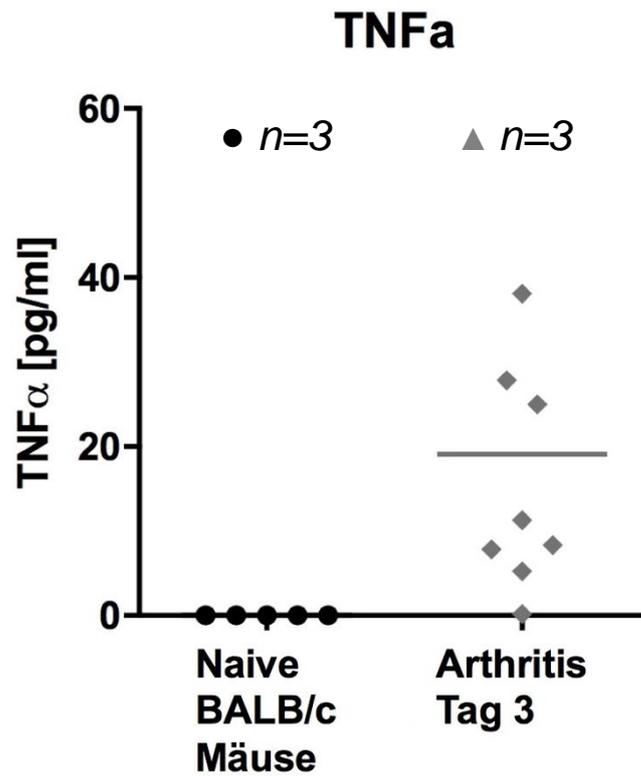


Abb. 18: Serum TNF- α Konzentrationen bei Arthritis-induzierten BALB/c-Mäusen (● $n=3$) im Vergleich zu naiven BALB/c-Mäusen (▲ $n=3$) gemessen an Tag 3

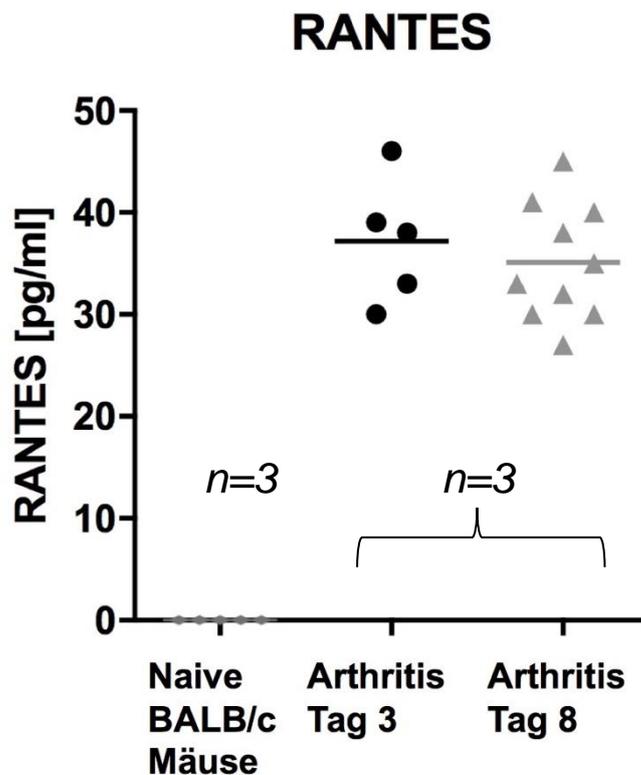


Abb. 19: Serum RANTES Konzentrationen bei Arthritis-induzierten BALB/c-Mäusen ($n=3$) im Vergleich zu naiven BALB/c-Mäusen (● $n=3$) gemessen an Tag 3 (●) und 8 (▲)

4. Diskussion

Die RA ist eine der häufigsten Erkrankungen des Kiefergelenks (Ricks et al. 2013) (Rice et al. 2017). Der durch den chronischen Entzündungsprozess verursachte fortschreitende Abbau führt zu einem Struktur- und Funktionsverlust des Kiefergelenks und geht mit einer schwerwiegenden Patientenmorbidity einher (Brand 2005) (Kouskoff et al. 1997). Trotz der großen Anstrengungen, die Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung zu verstehen, ist die genaue Entwicklung noch immer nicht gänzlich geklärt, was wiederum die Früherkennung, Prävention und Prognose erschwert (Heinegard et al. 2011). Insbesondere der Krankheitsausbruch, sowie die Etablierung sind zum jetzigen Zeitpunkt kaum am Menschen zu untersuchen, gleichwohl sie für zukünftige präventive Therapeutika möglicherweise entscheidend sind (Hettenkofer et al. 2014) (Asquith, Miller, McInnes, et al. 2009). Untersuchungen am Menschen können bei der Identifizierung gewisser ätiologischer Faktoren, sowie des Krankheitsverlaufs behilflich sein, bergen jedoch ebenso erhebliche Einschränkungen. So sind echte kinetische Analysen nur sehr schwer möglich, relevante Gewebe (z.B. Lymphknoten, Knochenmark, Milz) sind nicht ohne weiteres erhältlich und selbst im Synovialgewebe kann nur selten (und in der Regel nicht kontinuierlich) auf die Zielläsion zugegriffen werden (Asquith, Miller, McInnes, et al. 2009). Hieraus wird die Notwendigkeit für reproduzierbare Tiermodelle ersichtlich, die es ermöglichen die RA im Hinblick auf eine Ursache-Wirkungs-Beziehung gründlich zu erforschen und mögliche protektive Faktoren zu identifizieren (Asquith, Miller, McInnes, et al. 2009).

Es gibt kein einzelnes experimentelles Modell, das die gesamte Heterogenität der menschlichen RA umfasst. Es gibt jedoch eine Vielzahl von experimentellen Modellen, hauptsächlich an Nagetieren, welche es ermöglichen, die wichtigsten Aspekte der menschlichen RA einschließlich der Immunpathogenese, Prädiktormarker für die Entwicklung der Krankheit, sowie Behandlungsansätze zu beleuchten (Asquith, Miller, McInnes, et al. 2009). Auf diese Weise haben Sie unser Verständnis der grundlegenden Mechanismen der RA jeweils mit ihren individuellen Vor- und Nachteilen deutlich verbessert.

Bei der genetisch veränderten arthritischen K/BxN-Maus, werden ihre Anti-GPI-Antikörper auf Wildtyp Mäuse übertragen, die eine experimentelle systemische Polyarthrititis induzieren. Dieses Modell wird häufig angewendet und hat viel zum Verständnis der RA in Bezug auf Entzündung, Immunregulation und Autoimmunität beigetragen (Brand 2005). Die Entzündung basiert in diesem Falle auf T- und B-Zellen, die Autoantikörper sezernieren.

In letzter Zeit gab es verschiedene Versuche, die RA im Kiefergelenk an anderen Tiermodellen zu untersuchen. Dobsak et al. haben in ihrer aktuellen Studie die Phänotypen von humanen TNF- α transgenen Mäusen hinsichtlich ihres Parodontiums und des Kiefergelenks beschrieben (Dobsak et al. 2017). Ähnlich wie in unserer Studie haben die Autoren mit Hilfe von Computertomographie und histologischen Schnitten die destruktiven Charakteristika der RA im Kiefergelenk untersucht. Die Autoren stellten fest, dass ihre transgenen Mäuse schwere Destruktionen des Kiefergelenks aufwiesen. Zu beachten ist jedoch, dass das hTNFtg-Modell im Gegensatz zu unserem Modell ein chronisches Arthritismodell ist. Während die K/BxN-Serum-induzierten arthritischen Mäuse 8 Tage nach der Arthritisinduktion untersucht wurden, werden die TNF- α -Mäuse frühestens im Alter von 6 Wochen untersucht, wobei sie mit der Erkrankung geboren wurden und somit bereits eine mehr oder weniger chronische Form der Erkrankung entwickelt haben. Dasselbe gilt für das MRL-lpr/lpr-Modell von Haraldson et al., welches ebenfalls einen chronischeren Charakter aufweist als das seruminduzierte K/BxN-Modell (Haraldson et al. 1988). Darüber hinaus basieren die TNF- α -induzierten RA-Symptome auf einer viel unspezifischeren Ursache im Vergleich zu anderen RA-Modellen, wie dem K/BxN-Modell. TNF- α ist ein multifunktionales Zytokin, das an verschiedenen lokalen und systemischen Entzündungskrankheiten sowie an zahlreichen pathologischen Prozessen wie Infektionen, Ischämie und Traumata beteiligt ist (Feuerstein et al. 1994). Die beobachteten entzündlichen arthritischen Reaktionen sind unabhängig von T- und B-Zellen, wodurch dieses Modell keine Autoimmunität aufweist, obwohl dies ein ätiologisches Hauptmerkmal der RA ist.

Demgegenüber ist das von Ghassemi-Nejad et al. beschriebene Proteoglycan (PG) Aggrecan-induzierte Arthritismodell (PGIA) ein autoimmunes Arthritismodell (Ghassemi-Nejad et al. 2011). Die Autoren verglichen die Extremitätengelenke mit dem

Kiefergelenk und beobachteten, dass es zwar eine destruktive Synovitis in den Extremitäten gab, aber keine histologischen und immunhistochemischen Anzeichen einer Entzündung im Kiefergelenk, was unsere Ergebnisse bestätigt. Nur in schweren Fällen von Arthritis wurden Strukturschäden im Kiefergelenk festgestellt. Obwohl diese Ergebnisse unseren ähneln, wurde die Untersuchung des Kiefergelenks an den Tagen 49 und 50 durchgeführt, also in einem fortgeschritteneren Stadium der RA. Des Weiteren wurden die Zeichen der Destruktion noch deutlicher, je später das Stadium der Erkrankung war. Dies deutet darauf hin, dass der Zeitraum und damit die Phase der Arthritis eine entscheidende Rolle für das Ausmaß der zu beobachtenden Gelenkzerstörung spielt (siehe unten).

Abgesehen von diesen spontanen Arthritismodellen wurden in Bezug auf das Kiefergelenk zumeist entweder mechanische Irritationen oder destruktive Substanzen verwendet, die direkt in das Kiefergelenk injiziert werden, um eine Arthritis zu induzieren (Antigene, Zytokine, Antikörper usw.) (Ricks et al. 2013). Diese Modelle beschreiben jedoch nicht die für die RA-Pathogenese typischen endogenen Bruch der Eigentoleranz, so dass die Modelle deutliche Einschränkungen in ihrer Anwendbarkeit auf die RA aufweisen (Asquith, Miller, Hueber, et al. 2009).

Um zu beurteilen, ob wir die Ergebnisse früherer Studien am K/BxN-Serumtransfermodell für die Extremitätengelenke bestätigen können, haben wir Entzündungsprozesse im Kiefergelenk untersucht und mit denen der Extremitätengelenke verglichen.

Die Messung der Schwellung der Extremitätengelenke zeigte am sechsten und achten Tag nach dem Serumtransfer eine signifikante Zunahme des Durchmessers der Pfoten sowie eine Abnahme der Bewegungsaktivität gegenüber der Zeit vor dem Serumtransfer (siehe Abbildungen 9-11). Eine systemische Entzündungsreaktion konnten wir anhand der ELISA Untersuchungen nachweisen (siehe Abbildung 18 und 19). Darüber hinaus zeigten histologische und immunhistochemische Studien deutliche Anzeichen einer Entzündungsreaktion in den Extremitäten. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Studien zu diesem Thema überein (Wu et al. 2010). Wu et al. führten an, dass die

K/BxN-induzierte Arthritis stark von IL-17 abhängt. Eine direkte Hemmung dieses Zytokins auf B-Zellen und deren Bildung von Keimzentren verhinderte die Neutralisation von IL-17 und damit sogar die Arthritisentstehung in ihrer Studie (Wu et al. 2010).

Außerdem spielt VEGF (Vascular endothelial growth factor) eine wichtige Rolle bei der Progression der RA in murinen Modellen, sowohl bei chronischer als auch bei akuter Arthritis (Yang et al. 2012) (Murakami et al. 2006). Murakami et al. demonstrierten, dass VEGF und VEGF-Rezeptor-1 an der pathologischen Angiogenese, insbesondere während der RA beteiligt sind (Murakami et al. 2006). Im Gegensatz dazu, kann das Vorhandensein von Osteoprotegerin (OPG) eine schützende Wirkung auf die RA im Hinblick auf das Auftreten von Knochenresorptionen einnehmen (Ji et al. 2002) (Scofield 2014). Wie allgemein bekannt, sind Osteoklasten essentiell für den Prozess der Knochenresorption. In ihrer Abwesenheit tritt praktisch kein fokaler Abbau des Knochens auf. Da OPG die Aktivierung des RANK-vermittelten nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) verhindert, ist es nachvollziehbar, dass in Mäusen, welche vor einem K/BxN Serumtransfer eine Blockade von RANKL durch OPG-Behandlung erhalten hatten, eine Resistenz gegen Knochenerosion nachgewiesen werden konnte (Ji et al. 2002) (Scofield 2014).

Im Gegensatz zu den Extremitätengelenken konnten entzündliche Prozesse im Kiefergelenk weder klinisch, histologisch noch immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die dreidimensionalen Analysen mit μ -CT bestätigten diese Ergebnisse. Wir gehen davon aus, dass die folgenden Gründe für das Fehlen von Entzündungszeichen im Kiefergelenk wichtig sind, während sie in den Extremitätengelenken vorhanden sind.

4.1 Höhere mechanische Belastung der Extremitätengelenke:

Extremitätengelenke tragen in der Regel die Belastung durch das Teilkörpergewicht, während das Kiefergelenk nur während der Funktion belastet wird. Mehrere Studien haben gezeigt, dass mechanischer Stress, wie z.B. übermäßige Belastung, Traumata in den betroffenen Gelenken verursachen und somit die Auslösung von entzündlichen Gelenkerkrankungen deutlich beschleunigen kann (Heinegard et al. 2011) (Owsianik et al. 1980). Yaku et al. bestätigten diese These, in dem sie zeigten, dass die Händigkeit

im Sinne einer höheren mechanischen Beanspruchung eine signifikante Rolle für die erhöhte Inzidenz von RA in den dominanten Gelenken im Vergleich zu den nicht-dominanten Gelenken spielt (Yaku et al. 2016). Daher gehen wir davon aus, dass aufgrund der höheren mechanischen Belastung des Kniegelenks deutliche Anzeichen einer RA im Extremitätengelenk wahrscheinlicher sind als im Kiefergelenk.

4.2 Anatomisch-histologische Gründe:

Das Kiefergelenk weist ein spezielles retrodiskales Gewebe auf, welches stark vaskularisiert ist und somit als effizientes Drainagesystem für Gelenkexsudate dient. Auf diese Weise ist das Kiefergelenk eher in der Lage Schwellungen, Ödeme und Schmerzen zu lindern oder sogar zu verhindern (Lin et al. 2007) (Park 2015).

Noch wichtiger ist, dass die Gelenkstrukturen des Kiefergelenks mit Faserknorpel statt mit hyalinem Knorpel bedeckt sind, welches die meisten Extremitätengelenke überzieht (Ghassemi Nejad et al. 2017). Während Faserknorpel hauptsächlich aus Typ-I Kollagen besteht, dominiert der Anteil an Typ-II Kollagen im hyalinen Knorpel (Ghassemi Nejad et al. 2017). 1996 stellten Cook et al. fest, dass die Autoimmunität gegen Kollagen Typ-II eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der frühen RA spielt (Cook et al. 1996). 70 % der Patienten mit RA zeigten IgG-Autoantikörper gegen Typ-II Kollagen auf (Cook et al. 1996). Da zahlreiche Studien diese Befunde bestätigten, konnten neue Therapieoptionen zur Induktion antigenspezifischer peripherer Immuntoleranz zum Beispiel durch orale Verabreichung von Kollagen Typ-II etabliert werden (Barnett et al. 1998) (Iizuka et al. 2014) (Lindh et al. 2014). Darüber hinaus haben Heinegård et al. gezeigt, dass Veränderungen in der extrazellulären Matrix des Knorpels eine grundlegende Rolle bei der Pathogenese der Osteoarthritis (OA) spielen (Heinegard et al. 2011). Sie zeigten, dass höhere Konzentrationen von Typ-II Kollagen mit einer erhöhten Inzidenz von OA assoziiert waren (Heinegard et al. 2011).

2008 wiesen Tanaka et al. außerdem darauf hin, dass Faserknorpel gewisse Anpassungsfähigkeiten gegen mechanische Beanspruchung bietet und die Fähigkeit besitzt, sich bei übermäßigen Kräften umzugestalten und adaptive Fähigkeiten zu entwickeln (Arnett et al. 1996) (Tanaka et al. 2008).

Im Angesicht dieser Überlegungen und in Anlehnung an die Ergebnisse dieser Studie liegt die Vermutung nahe, dass das Kiefergelenk weniger anfällig für die Initiation einer RA ist als Extremitätengelenke.

4.3 Prä- und postnatale Entwicklung:

Die Einzigartigkeit der pränatalen Morphogenese des Kiefergelenks wird seit den 1950er Jahren insbesondere von Symons et al. sowie Baume et al. aufgezeigt (Symons 1952) (Baume et al. 1961).

Während die Epiphysenplatten der langen Knochen aus dem ursprünglichen Knorpelskelett stammen, entwickelt sich der Kondylenknorpel unabhängig davon als Sekundärknorpel, der auf den Unterkieferknochen aufgefropft wird (Symons 1952) (Baume et al. 1961). Im Gegensatz zum interstitiellen Wachstum der Epiphysenplatten entsteht der Kondylenknorpel zudem durch Oberflächenanlagerung in einer peripheren Faserknorpelschicht (Symons 1952) (Baume et al. 1961). Während der postnatalen Entwicklung gibt es keine Bildung von sekundären Ossifikationszentren im Kiefergelenkknorpel, wie sie in anderen Knorpelknochen vorkommen (Symons 1952) (Baume et al. 1961). Aus diesem Grund erodiert dieser Knorpel nie vollständig und wird auch nicht versiegelt, wie es in den Epiphysenplatten geschieht (Symons 1952) (Baume et al. 1961). Es wird vermutet, dass dies dazu beiträgt, dass der endochondrale Wachstumsapparat der Unterkieferkondylen positiv auf mechanische Reize reagieren kann (Symons 1952) (Baume et al. 1961). Im Gegensatz dazu bleiben die epiphysären Knorpelplatten relativ unempfindlich gegen mechanische Reize (Symons 1952) (Baume et al. 1961). Die beschriebene kontinuierliche Anpassungsfähigkeit der Kiefergelenksknorpel deutet darauf hin, dass die Kiefergelenke im Vergleich zu anderen Gelenken, besser in der Lage sind, Insulten standzuhalten und diese zu kompensieren. Wie oben beschrieben, gehen diese Überlegungen mit denen von Tanaka et al. einher (Tanaka et al. 2008).

4.4 Zeitfaktor

Aus den oben genannten Gründen ist es möglich, dass die Initiation der RA im Kiefergelenk länger dauert als in den Extremitätengelenken. Da die Tiere am achten Tag

bei maximalen Anzeichen einer klinischen Entzündung histologisch aufbereitet wurden, konnte eine spätere Untersuchung des Kiefergelenks nicht durchgeführt werden. Eine Wiederholung des Serumtransfers zwei Wochen nach dem ersten Transfer, gefolgt von einer späteren Untersuchung der Gelenke, könnte zu unterschiedlichen Ergebnissen führen und Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Im Gegensatz zu unseren Befunden zeigten Kapila et al., dass schwere Arthritis und Pannusbildung in ihrem (Kaninchen-)Modell nach 5 Tagen auftraten und bis zu 55 Tage anhielten (Kapila et al. 1995). Anders als in unserem Tiermodell induzierten Kapila et al. jedoch Arthritiden durch topische intraartikuläre Verabreichung von Ovalbumin (Kapila et al. 1995).

Haraldson et al. verwendeten ein systemisch induziertes RA-Modell und zeigten, dass nach sechs Monaten ihre MRL/I-Mäuse zwar eine RA in den Extremitätengelenken entwickelten, in den Kiefergelenken jedoch seltener und weniger stark (Haraldson et al. 1988). Die Ergebnisse unterstützen demnach die oben aufgeführten Erklärungsansätze und die Daten der vorliegenden Arbeit.

4.5 Weiterer Ausblick und Diskussion verschiedener Arthritismodelle

Um weitergehend zu verstehen, wie es zu den Ergebnissen dieser Studie gekommen ist und um die Pathomechanismen der RA weiter zu erforschen, könnten weiterführende Studien mit ähnlichem Studiendesign allerdings an anderen Arthritis-Tiermodellen nützlich sein.

In diesem Zusammenhang ist es sinnvoll, die einzelnen Modelle genauer im Hinblick auf ihre Spezifität für die unterschiedlichen Arthritisstadien (Verlust der Eigentoleranz, Synovitis und Gelenkschädigung, etablierte/chronische Arthritis) zu betrachten (Benson et al. 2018). Im Folgenden werden daher einige Arthritis-Tiermodelle im Kontext der unterschiedlichen Krankheitsstadien vorgestellt.

4.5.1 Arthritismodelle für Phase I: Verlust der Eigentoleranz

Die Untersuchung des Krankheitsbeginns, also dem Bruch der Eigentoleranz, ist eine Hauptaufgabe, um effektivere Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können. Die meisten Therapieansätze beschäftigen sich mit dem Ziel der Minderung der Krankheitssymptome oder der Wiederherstellung der anatomisch-funktionellen Strukturen. Die große therapeutische Hürde ist aber die Wiederherstellung der antigenspezifischen Toleranz bei RA und die damit verbundene medikamentenfreie Remission (Isaacs 2007) (Suwandi et al. 2015) (Thomas 2013).

Für die Deutung unserer Ergebnisse wäre es hilfreich mit geeigneten Arthritismodellen zu untersuchen, ob bereits in dieser Phase Unterschiede zwischen den Extremitäten- und Kiefergelenken existieren. Die zwei unten aufgeführten Modelle sind für Untersuchungen des ersten Stadiums laut Benson et al. geeignet (Benson et al. 2018).

Skj-Maus:

Durch eine Punktmutation des ZAP-70 kommt es bei betroffenen Versuchstieren zum Ausbruch einer entzündlichen Arthritis, welche zum Teil auf eine veränderte T-Zellsekretion des Thymus zurückzuführen ist, woraufhin die Mäuse autoreaktive T- und B-Zellen produzieren (Sakaguchi et al. 2003). Darüber hinaus ist eine starke Abhängigkeit von Umweltfaktoren wie der Mikroflora gegeben, weshalb sich die Krankheit bei keimfreien Mäusen nicht etabliert (Sakaguchi et al. 2003).

HLA-II Maus:

Dieses Modell mit genetisch modifizierten Versuchstieren für diverse HLA assoziierte Gene führt zu einer genetischen Anfälligkeit für die RA. Dieses Modell eignet sich insbesondere zur Untersuchung von Mechanismen, die bei dem Bruch der Eigentoleranz während der RA eine Rolle spielen (Taneja et al. 2010).

4.5.2 Arthritismodell für Phase II: Synovitis und Gelenkschäden

RA Patienten können über Jahre hinweg symptomfrei sein. Bei Ausbruch der RA kommt es dann zur Anreicherung von Immunzellen im Gelenk, wodurch es zur Synovitis und

Gelenkschädigungen kommt (Benson et al. 2018). Der genaue Übergang von einer zur anderen Phase ist immer noch nicht geklärt (Benson et al. 2018). In unserer Studie wurde die Phase II zwar für die Extremitätengelenke bereits erreicht, allerdings nicht für die Kiefergelenke. Neben dem K/BxN Serum-Induktionsmodell, stellt das Kollagen-Antikörper-induzierte Arthritismodell ein anderes relevantes Modell für eine weitere Vergleichsanalyse dar. Dieses Modell könnte den Einfluss des Kollagentyps in den unterschiedlichen Gelenken verifizieren bzw. widerlegen (Asquith, Miller, McInnes, et al. 2009). Der Ansatz dieses Modells ist es, Autoantikörper gegen Kollagen Typ-II von einer immunisierten Maus mittels Serumtransfers auf eine nicht immunisierte Empfängermaus zu übertragen. Dieses Modell ist durch Makrophagen- und polymorphkernige entzündliche Zellinfiltrate charakterisiert und manifestiert sich nach 48 Stunden ähnlich dem Serum-induzierten K/BxN Modell (Santos et al. 1997) (Nandakumar et al. 2004).

4.5.3 Arthritismodelle für Phase III: Etablierte/chronische Arthritis

Durch die in der Diskussion genannten Gründe ist es denkbar, dass es im Kiefergelenk erst bei längerer Versuchsdauer zu einer Arthritismanifestation kommt.

Wie ebenfalls bereits erwähnt, wäre die Verlängerung des Versuches durch einen erneuten Serumtransfer und Untersuchung der Versuchstiere zu einem späteren Zeitpunkt von Interesse. Eine erweiterte Möglichkeit bietet die Untersuchung der K/BxN Maus selbst, welche in jedem Falle eine chronische Erkrankung entwickelt. Im Gegensatz zu den durch Serumtransfer arthritischen BALB/c Mäusen weisen die K/BxN Mäuse zudem eine T- und B-Zellbeteiligung auf, was ein erweitertes Untersuchungsspektrum eröffnet (Benson et al. 2018).

4.6 Schlussfolgerung

Unsere Studie zeigt zum ersten Mal, dass das K/BxN-Arthritismodell für eine vergleichende Analyse der verschiedenen Pathogenese und Abwehrmechanismen der RA im Kiefergelenk und in den Extremitätengelenken geeignet sein könnte. Wir konnten unsere Nullhypothese widerlegen und aufzeigen, dass das Kiefergelenk aufgrund seiner anatomischen und mechanischen Eigenschaften weniger anfällig für die Initiation der RA zu sein scheint als die Extremitätengelenke. Um das Verständnis dieser Autoimmunerkrankung weiter zu verbessern, bedarf es jedoch weiterer intensiver Forschung.

5. Zusammenfassung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine häufige, chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung unklarer Genese. Die Erkrankung führt zu einer fortschreitenden Destruktion des Gelenks und verursacht schließlich einen Verlust von Struktur und Funktion. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist eine systematische vergleichende Analyse der RA-induzierten Pathomechanismen im Kiefergelenk mit denen der Extremitätengelenke unter Verwendung des K/BxN seruminduktions Arthritismodells.

In 18 BALB/c Mäusen im Alter von 20 Wochen erfolgte mittels 100 µl intraperitoneal injiziertem arthritogenetischem K/BxN Mausserum die Induktion einer Gelenkarthritis. Eine weitere Gruppe von 12 BALB/c Mäusen ohne Serumtransfer diente als Kontrollgruppe. Zur klinischen Evaluation der Gelenkentzündung wurden zum Zeitpunkt kurz vor und alle 2 Tage nach Serumtransfer die Gelenkschwellung aller vier Pfoten mittels Mikrometer gemessen. In diesem Zusammenhang erfolgte zusätzlich eine Messung der lokomotorischen Aktivität mit Hilfe einer motion tracking Kamera.

Während des klinischen Entzündungsmaximums am 8. Tag nach Serumtransfer erfolgte eine dreidimensionale Untersuchung des Kiefergelenkes mittels Mikro-Computertomographie (µCT), gefolgt von einer histologischen Aufbereitung der Extremitätengelenke und des Kiefergelenkes zur Beurteilung der Gelenkmorphologie. Die Zytokinkonzentrationen im Serum von Versuchs- und Kontrolltieren wurden mittels ELISA Untersuchungen durchgeführt. Zudem wurden immunhistochemische Untersuchungen zur Evaluation entzündlicher und immunologischer Veränderungen durchgeführt.

Die ELISA Auswertung offenbarte eine ausgeprägte systemische Entzündungsreaktion. Die Extremitätengelenke zeigten ebenfalls deutliche Zeichen einer klinisch und histologisch manifestierten Entzündung. Entsprechend zeigten die Messungen der Gelenkschwellung zum Zeitpunkt 6 und 8 Tage nach Serumtransfer einen signifikanten Anstieg des Pfortendurchmessers im Vergleich zum Zeitpunkt vor Serumtransfer. Die histologischen Untersuchungen zeigten in der arthritischen Gruppe Zellinfiltrationen, Hyperplasien, sowie Degeneration des Knorpel- und Knochengewebe.

Korrespondierend dazu war die Expression der Entzündungsmarker im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht.

Im Gegensatz dazu konnten im Kiefergelenk keine Hinweise auf ähnliche Entzündungsprozesse detektiert werden. Die histologischen und immunhistologischen Untersuchungen ergaben physiologische Verhältnisse und die dreidimensionalen Analysen mittels μ CT bestätigten diese Ergebnisse.

Das K/BxN-Arthritismodell eignet sich zur vergleichenden Analyse der unterschiedlichen Pathogenese und Abwehrmechanismen der RA im Kiefer- und den Extremitätengelenken. Unterschiedliche anatomische und mechanische Eigenschaften könnten der Grund für die geringere Anfälligkeit des Kiefergelenks für eine RA sein. Diese Ergebnisse unterstreichen die Komplexität der RA in Bezug auf die Ätiopathogenese und ihre Einflussfaktoren. Zum besseren Verständnis der Erkrankung und Reevaluation unserer Ergebnisse bedarf es daher intensiver weiterführender Forschung mit Implementierung unterschiedlicher Mausmodelle.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologischer Aufbau des kondylären Knorpels

Abbildung 2: Histologischer Aufbau des Kniegelenks

Abbildung 3: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien der Rheumatoiden Arthritis 2010 (Schneider et al. 2013)

Abbildung 4: Klinisches Beispiel eines Patienten mit einer JIA (Fernröntgenseitenaufnahme)

Abbildung 5: Klinisches Beispiel eines Patienten mit einer JIA (Panoramaübersichtsaufnahme)

Abbildung 6: K/BxN Mausmodell

Abbildung 7: Übersicht des zeitlichen Verlaufs der Versuche mit entsprechenden Versuchstierzahlen

Abbildung 8: Workflow zur dreidimensionalen Rekonstruktion der Kiefergelenke

Abbildung 9: Knöcheldicke der Vorderläufe der Arthritis-induzierten BALB/c-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe

Abbildung 10: Knöcheldicke der Hinterläufe der Arthritis-induzierten BALB/c-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe

Abbildung 11: Bewegungsaktivität der Arthritis-induzierten BALB/c-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe über einen Zeitraum von 15 Tagen

Abbildung 12: 3-D- μ CT-Aufnahme des Unterkieferkondylus

Abbildung 13: Histologische Schnitte im Kniegelenk (10x). H&E-Färbung

Abbildung 14: Histologische Schnitte des Kiefergelenks (10x). H&E-Färbung

Abbildung 15: Histologische Schnitte im Kniegelenk (20x). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Abbildung 16: Histologische Schnitte im Kniegelenk (20x). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen Interleukin-17 (IL-17)

Abbildung 17: Histologische Schnitte im Kniegelenk (20x). Immunhistochemische Färbung mittels Antikörper gegen Osteoprotegerin (OPG)

Abbildung 18: TNF- α Serumkonzentration

Abbildung 19: RANTES Serumkonzentration

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Semiquantitativer Score zur Analyse der Immunreaktion

Tabelle 2: Immunreaktionen der Knie- und Kiefergelenke im Vergleich zwischen der Arthritischen Gruppe und der Kontrollgruppe

8. Literaturverzeichnis

Aletaha D, Alasti F, and Smolen JS. Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis Res Ther* 2015;17: 229

Anquetil F, Clavel C, Offer G, Serre G, and Sebbag M. IgM and IgA rheumatoid factors purified from rheumatoid arthritis sera boost the Fc receptor- and complement-dependent effector functions of the disease-specific anti-citrullinated protein autoantibodies. *J Immunol* 2015;194: 3664-3674

Arnett GW, Milam SB, and Gottesman L. Progressive mandibular retrusion-idiopathic condylar resorption. Part II. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1996;110: 117-127

Asquith DL, Miller AM, Hueber AJ, Mckinnon HJ, Sattar N, Graham GJ, and McInnes IB. Liver X receptor agonism promotes articular inflammation in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60: 2655-2665

Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, and Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. *European journal of immunology* 2009;39: 2040-2044

Bag AK, Gaddikeri S, Singhal A, Hardin S, Tran BD, Medina JA, and Cure JK. Imaging of the temporomandibular joint: An update. *World J Radiol* 2014;6: 567-582

Balsa A, Cabezon A, Orozco G, Cobo T, Miranda-Carus E, Lopez-Nevot MA, Vicario JL, Martin-Mola E, Martin J, and Pascual-Salcedo D. Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. *Arthritis Res Ther* 2010;12: R62

Barnett ML, Kremer JM, St Clair EW, Clegg DO, Furst D, Weisman M, Fletcher MJ, Chasan-Taber S, Finger E, Morales A, Le CH, and Trentham DE. Treatment of rheumatoid arthritis with oral type II collagen. Results of a multicenter, double-blind,

placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 1998;41: 290-297

Baume LJ, and Derichsweiler H. Response of condylar growth cartilage to induced stresses. *Science* 1961;134: 53-54

Benjamin M, and Ralphs J. Biology of fibrocartilage cells. *International review of cytology* 2004;233: 1-46

Benninghoff A, Drenckhahn D, and Waschke J. 2008. *Taschenbuch anatomie* (Elsevier, Urban & Fischer München).

Benson RA, McInnes IB, Garside P, and Brewer JM. Model answers: Rational application of murine models in arthritis research. *Eur J Immunol* 2018;48: 32-38

Brand DD. Rodent models of rheumatoid arthritis. *Comp Med* 2005;55: 114-122

Bumann A, and Lotzmann U. 1999. *Band 12: Funktionsdiagnostik und Therapieprinzipien. Zus.-Arb.: Axel Bumann, Ulrich Lotzmann 858 meist farbige Abbildungen in 1304 Einzeldarstellungen* (Georg Thieme Verlag).

Chang SH, Yasui T, Taketomi S, Matsumoto T, Kim-Kaneyama JR, Omiya T, Hosaka Y, Inui H, Omata Y, Yamagami R, Mori D, Yano F, Chung U, Tanaka S, and Saito T. Comparison of mouse and human ankles and establishment of mouse ankle osteoarthritis models by surgically-induced instability. *Osteoarthritis Cartilage* 2016;24: 688-697

Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, and Becher B. ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 2011;12: 560-567

Cook AD, Rowley MJ, Mackay IR, Gough A, and Emery P. Antibodies to type II collagen

in early rheumatoid arthritis. Correlation with disease progression. *Arthritis Rheum* 1996;39: 1720-1727

Costenbader KH, Chang SC, Laden F, Puett R, and Karlson EW. Geographic variation in rheumatoid arthritis incidence among women in the United States. *Arch Intern Med* 2008;168: 1664-1670

Deighton C, and Criswell LA. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8: 394-400

Dintzis S, and Treuting P. 2011. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas* (Academic).

Ditzel HJ. The K/BxN mouse: a model of human inflammatory arthritis. *Trends Mol Med* 2004;10: 40-45

Dobsak T, Heimel P, Tangl S, Schwarze UY, Schett G, and Gruber R. Impaired periodontium and temporomandibular joints in tumour necrosis factor - α transgenic mice. *Journal of clinical periodontology* 2017;44: 1226-1235

Doran MF, Pond GR, Crowson CS, O'fallon WM, and Gabriel SE. Trends in incidence and mortality in rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, over a forty-year period. *Arthritis Rheum* 2002;46: 625-631

Eastgate JA, Symons JA, Wood NC, Grinlinton FM, Di Giovine FS, and Duff GW. Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1988;2: 706-709

Ebringer A, and Wilson C. HLA molecules, bacteria and autoimmunity. *J Med Microbiol* 2000;49: 305-311

Feuerstein GZ, Liu T, and Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury: role of

tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1994;6: 341-360

Friedl A. 2011. "Deutsche Rheuma-Liga: Fakten über Rheuma. Aktualisiert: 2. Aufl., 2011, Aufruf am: 01.04. 2014." In.

Frommholz D, and Illges H. Maximal locomotor depression follows maximal ankle swelling during the progression of arthritis in K/BxN mice. *Rheumatol Int* 2012;32: 3999-4003

Ghassemi Nejad S, Kobezda T, Tar I, and Szekanecz Z. Development of temporomandibular joint arthritis: The use of animal models. *Joint Bone Spine* 2017;84: 145-151

Ghassemi-Nejad S, Kobezda T, Rauch T, Matesz C, Glant T, and Mikecz K. Osteoarthritis-like damage of cartilage in the temporomandibular joints in mice with autoimmune inflammatory arthritis. *Osteoarthritis and cartilage* 2011;19: 458-465

Golz L, Buerfent BC, Hofmann A, Hubner MP, Ruhl H, Fricker N, Schmidt D, Johannes O, Jepsen S, Deschner J, Hoerauf A, Nothen MM, Schumacher J, and Jager A. Genome-wide transcriptome induced by *Porphyromonas gingivalis* LPS supports the notion of host-derived periodontal destruction and its association with systemic diseases. *Innate Immun* 2016;22: 72-84

Gonzalez A, Icen M, Kremers HM, Crowson CS, Davis JM, 3rd, Therneau TM, Roger VL, and Gabriel SE. Mortality trends in rheumatoid arthritis: the role of rheumatoid factor. *J Rheumatol* 2008;35: 1009-1014

Graber TM. Anatomische und physiologische Aspekte bei der Behandlung von Kiefergelenkstörungen. *Fortschritte der Kieferorthopädie* 1991;52: 126-132

Haraldson T, Jonsson R, and Tarkowski A. Spontaneous temporomandibular joint arthropathy in MRL-lpr/lpr mice. *J Oral Pathol* 1988;17: 386-389

Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, Jakobsson PJ, Baum W, Nimmerjahn F, Szarka E, Sarmay G, Krumbholz G, Neumann E, Toes R, Scherer HU, Catrina AI, Klareskog L, Jurdic P, and Schett G. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest* 2012;122: 1791-1802

Heinegard D, and Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7: 50-56

Hemminki K, Li X, Sundquist J, and Sundquist K. Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. *Arthritis Rheum* 2009;60: 661-668

Hettenkofer H-J, Schneider M, and Braun J. 2014. *Rheumatologie: Diagnostik-Klinik-Therapie* (Georg Thieme Verlag).

Hinton RJ. Genes that regulate morphogenesis and growth of the temporomandibular joint: a review. *Developmental Dynamics* 2014;243: 864-874

Honda K, and Littman DR. The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annual review of immunology* 2012;30: 759-795

Iizuka M, Wakasa Y, Tsuboi H, Asashima H, Hirota T, Kondo Y, Matsumoto I, Takaiwa F, and Sumida T. Suppression of collagen-induced arthritis by oral administration of transgenic rice seeds expressing altered peptide ligands of type II collagen. *Plant Biotechnol J* 2014;12: 1143-1152

Isaacs JD. T cell immunomodulation--the Holy Grail of therapeutic tolerance. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7: 418-425

Ishikawa LL, Shoenfeld Y, and Sartori A. Immunomodulation in human and experimental arthritis: including vitamin D, helminths and heat-shock proteins. *Lupus* 2014;23: 577-

587

Ji H, Pettit A, Ohmura K, Ortiz-Lopez A, Duchatelle V, Degott C, Gravallesse E, Mathis D, and Benoist C. Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis. *J Exp Med* 2002;196: 77-85

Kaipainen-Seppanen O, and Kautiainen H. Declining trend in the incidence of rheumatoid factor-positive rheumatoid arthritis in Finland 1980-2000. *J Rheumatol* 2006;33: 2132-2138

Kalla AA, and Tikly M. Rheumatoid arthritis in the developing world. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003;17: 863-875

Kapila S, Lee C, Tavakkoli Jou MR, Miller AJ, and Richards DW. Development and histologic characterizations of an animal model of antigen-induced arthritis of the juvenile rabbit temporomandibular joint. *J Dent Res* 1995;74: 1870-1879

Karaharju-Suvanto T, Peltonen J, Laitinen O, and Kahri A. The effect of gradual distraction of the mandible on the sheep temporomandibular joint. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1996;25: 152-156

Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, and Mathis D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 1996;87: 811-822 A new mouse model of rheumatoid arthritis: organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Ryumachi* 1997;37: 147

Liao KP, Alfredsson L, and Karlson EW. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2009;21: 279-283

Lin Y-C, Hsu M-L, Yang J-S, Liang T-H, Chou S-L, and Lin H-Y. Temporomandibular joint disorders in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of the Chinese Medical Association* 2007;70: 527-534

Lindh I, Snir O, Lönnblom E, Uysal H, Andersson I, Nandakumar KS, Vierboom M, Hart BT, Malmström V, and Holmdahl R. Type II collagen antibody response is enriched in the synovial fluid of rheumatoid joints and directed to the same major epitopes as in collagen induced arthritis in primates and mice. *Arthritis research & therapy* 2014;16: R143

Lipsky P, and Davis L. The central involvement of T cells in rheumatoid arthritis. *Immunologist* 1998;6: 121-128

Ludvigsson JF, Nordenvall C, and Jarvholm B. Smoking, use of moist snuff and risk of celiac disease: a prospective study. *BMC Gastroenterol* 2014;14: 120

Lukat TD, Perschbacher SE, Pharoah MJ, and Lam EW. The effects of voxel size on cone beam computed tomography images of the temporomandibular joints. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2015;119: 229-237

Manners PJ, and Bower C. Worldwide prevalence of juvenile arthritis why does it vary so much? *J Rheumatol* 2002;29: 1520-1530

Maresz KJ, Hellvard A, Sroka A, Adamowicz K, Bielecka E, Koziel J, Gawron K, Mizgalska D, Marcinska KA, and Benedyk M. *Porphyromonas gingivalis* facilitates the development and progression of destructive arthritis through its unique bacterial peptidylarginine deiminase (PAD). *PLoS pathogens* 2013;9: e1003627

Martel-Pelletier J, Welsch DJ, and Pelletier JP. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001;15: 805-829

McInnes IB, and Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365: 2205-2219

Miller E, Inarejos Clemente EJ, Tzaribachev N, Guleria S, Tolend M, Meyers AB, Von Kalle T, Stimec J, Koos B, Appenzeller S, Arvidsson LZ, Kirkhus E, Doria AS,

Kellenberger CJ, and Larheim TA. Imaging of temporomandibular joint abnormalities in juvenile idiopathic arthritis with a focus on developing a magnetic resonance imaging protocol. *Pediatr Radiol* 2018;48: 792-800

Mizoguchi I, Nakamura M, Takahashi I, Kagayama M, and Mitani H. An immunohistochemical study of localization of type I and type II collagens in mandibular condylar cartilage compared with tibial growth plate. *Histochemistry* 1990;93: 593-599. A comparison of the immunohistochemical localization of type I and type II collagens in craniofacial cartilages of the rat. *Acta Anat (Basel)* 1992;144: 59-64

Monach P, Hattori K, Huang H, Hyatt E, Morse J, Nguyen L, Ortiz-Lopez A, Wu HJ, Mathis D, and Benoist C. The K/BxN mouse model of inflammatory arthritis: theory and practice. *Methods Mol Med* 2007;136: 269-282

Murakami M, Iwai S, Hiratsuka S, Yamauchi M, Nakamura K, Iwakura Y, and Shibuya M. Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood* 2006;108: 1849-1856

Nandakumar KS, Bäcklund J, Vestberg M, and Holmdahl R. Collagen type II (CII)-specific antibodies induce arthritis in the absence of T or B cells but the arthritis progression is enhanced by CII-reactive T cells. *Arthritis Res Ther* 2004;6: R544

Nepom GT, Gersuk V, and Nepom BS. Prognostic implications of HLA genotyping in the early assessment of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 1996;44: 5-9

Nielen MM, Van Schaardenburg D, Reesink HW, Van De Stadt RJ, Van Der Horst-Bruinsma IE, De Koning MH, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, and Dijkmans BA. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004;50: 380-386

O'connor RC, Fawthrop F, Salha R, and Sidebottom AJ. Management of the temporomandibular joint in inflammatory arthritis: Involvement of surgical procedures.

Eur J Rheumatol 2017;4: 151-156

O'dell JR, Nepom BS, Haire C, Gersuk VH, Gaur L, Moore GF, Drymalski W, Palmer W, Eckhoff PJ, Klassen LW, Wees S, Thiele G, and Nepom GT. HLA-DRB1 typing in rheumatoid arthritis: predicting response to specific treatments. *Ann Rheum Dis* 1998;57: 209-213

Owsianik WD, Kundi A, Whitehead JN, Kraag GR, and Goldsmith C. Radiological articular involvement in the dominant hand in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1980;39: 508-510

Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, and Klareskog L. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50: 3085-3092

Park CK. Maresin 1 Inhibits TRPV1 in Temporomandibular Joint-Related Trigeminal Nociceptive Neurons and TMJ Inflammation-Induced Synaptic Plasticity in the Trigeminal Nucleus. *Mediators Inflamm* 2015;2015: 275126

Petrovic-Rackov L, and Pejnovic N. Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF- α measurement in rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology* 2006;25: 448-452

Pettit AR, Ji H, Von Stechow D, Muller R, Goldring SR, Choi Y, Benoist C, and Gravallesse EM. TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol* 2001;159: 1689-1699

Prots I, Skapenko A, Wendler J, Mattyasovszky S, Yone CL, Spriewald B, Burkhardt H, Rau R, Kalden JR, Lipsky PE, and Schulze-Koops H. Association of the IL4R single-nucleotide polymorphism I50V with rapidly erosive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54: 1491-1500

Redlich K, Hayer S, Ricci R, David JP, Tohidast-Akrad M, Kollias G, Steiner G, Smolen

JS, Wagner EF, and Schett G. Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. *J Clin Invest* 2002;110: 1419-1427

Rice DD, Abramovitch K, Roche S, Cora CA, Torralba KD, Christensen HL, and Christiansen EL. Undiagnosed, chronic temporomandibular joint pain: making a case for FDG-PET/CT. *Int J Rheum Dis* 2017;20: 2122-2126

Ricks ML, Farrell JT, Falk DJ, Holt DW, Rees M, Carr J, Williams T, Nichols BA, Bridgewater LC, Reynolds PR, Kooyman DL, and Seegmiller RE. Osteoarthritis in temporomandibular joint of Col2a1 mutant mice. *Arch Oral Biol* 2013;58: 1092-1099

Sabharwal UK, Vaughan JH, Fong S, Bennett PH, Carson DA, and Curd JG. Activation of the classical pathway of complement by rheumatoid factors. Assessment by radioimmunoassay for C4. *Arthritis Rheum* 1982;25: 161-167

Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, and Nakatsuru S. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 2003;426: 454

Santos L, Morand E, Hutchinson P, Boyce N, and Holdsworth S. Anti - neutrophil monoclonal antibody therapy inhibits the development of adjuvant arthritis. *Clinical & Experimental Immunology* 1997;107: 248-253

Scapinelli R. Studies on the vasculature of the human knee joint. *Acta Anat (Basel)* 1968;70: 305-331

Scher JU, Littman DR, and Abramson SB. Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheumatol* 2016;68: 35-45

Scher JU, Ubeda C, Artacho A, Attur M, Isaac S, Reddy SM, Marmon S, Neimann A, Brusca S, Patel T, Manasson J, Pamer EG, Littman DR, and Abramson SB. Decreased

bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Arthritis Rheumatol* 2015;67: 128-139

Schneider M. 2011. *Interdisziplinäre Leitlinie Management der frühen rheumatoiden Arthritis: www.dgrh.de/leitlinien.html* (Springer).

Schneider M, and Krüger K. Rheumatoid arthritis—early diagnosis and disease management. *Deutsches Ärzteblatt International* 2013;110: 477

Scofield RH. Rheumatic diseases and the microbiome. *Int J Rheum Dis* 2014;17: 489-492

Scott DL, Wolfe F, and Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010;376: 1094-1108

Sculco TP. The knee joint in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1998;24: 143-156

Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, Chao CC, Sathe M, Grein J, Gorman DM, Bowman EP, Mcclanahan TK, Yearley JH, Eberl G, Buckley CD, Kastelein RA, Pierce RH, Laface DM, and Cua DJ. IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR-gammat+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nat Med* 2012;18: 1069-1076

Silvestre-Rangil J, Bagan L, Silvestre FJ, and Bagan JV. Oral manifestations of rheumatoid arthritis. A cross-sectional study of 73 patients. *Clin Oral Investig* 2016;20: 2575-2580

Smolen JS, Aletaha D, Bijlsma JW, Breedveld FC, Boumpas D, Burmester G, Combe B, Cutolo M, De Wit M, Dougados M, Emery P, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Haraoui B, Kalden J, Keystone EC, Kvien TK, Mcinnes I, Martin-Mola E, Montecucco C, Schoels M, Van Der Heijde D, and Committee TTE. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis* 2010;69: 631-637

Sokolove J, Johnson DS, Lahey LJ, Wagner CA, Cheng D, Thiele GM, Michaud K, Sayles H, Reimold AM, and Caplan L. Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2014;66: 813-821

Strub JR. 1994. *Curriculum prothetik* (Quintessenz-Verl.).

Suwandi JS, Toes RE, Nikolic T, and Roep BO. Inducing tissue specific tolerance in autoimmune disease with tolerogenic dendritic cells. *Clin Exp Rheumatol* 2015;33: S97-103

Suzuki A, and Iwata J. Mouse genetic models for temporomandibular joint development and disorders. *Oral Dis* 2016;22: 33-38

Symons NB. The development of the human mandibular joint. *J Anat* 1952;86: 326-32

Tanaka E, Detamore MS, Tanimoto K, and Kawai N. Lubrication of the temporomandibular joint. *Ann Biomed Eng* 2008;36: 14-29

Tanaka N, Masuko T, and Ishii S. A retrospective study using nail clippings of rheumatoid susceptible alleles of HLA-DRB1 as a prognostic factor in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999;26: 767-772

Taneja V, and David CS. Role of HLA class II genes in susceptibility/resistance to inflammatory arthritis: studies with humanized mice. *Immunol Rev* 2010;233: 62-78

Tao JH, Cheng M, Tang JP, Liu Q, Pan F, and Li XP. Foxp3, Regulatory T Cell, and Autoimmune Diseases. *Inflammation* 2017;40: 328-339

Thomas R. Dendritic cells and the promise of antigen-specific therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2013;15: 204

Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronckowiak Z, Jacob CO, McDermott M, Sinha AA, Timmerman L, Steinman L, and Et Al. A molecular basis for MHC class II--associated autoimmunity. *Science* 1988;240: 1003-1009

Trum S. 2009. 'Mittelfristige Ergebnisse der Chemosynoviorthese mit Natriummorrhuat'.

Van Der Helm-Van AH, and Huizinga TW. Advances in the genetics of rheumatoid arthritis point to subclassification into distinct disease subsets. *Arthritis research & therapy* 2008;10: 205

Van Gaalen FA, Van Aken J, Huizinga TW, Schreuder GMT, Breedveld FC, Zanelli E, Van Venrooij WJ, Verweij CL, Toes RE, and De Vries RR. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2004;50: 2113-2121

Van Oosterhout M, Bajema I, Levarht EW, Toes RE, Huizinga TW, and Van Laar JM. Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58: 53-60

Villeneuve E, Nam J, and Emery P. 2010 ACR-EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol* 2010;50: 481-483

Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, and Venables PJ. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62: 2662-2672

Welsch U. 2006. *Sobotta Lehrbuch Histologie mit StudentConsult-Zugang: Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie. StudentConsult* (Elsevier, Urban&FischerVerlag).

Wirtz DC. 2010. *AE-Manual der Endoprothetik: Knie* (Springer-Verlag).

Wu HJ, Ivanov, Ii, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, Littman DR, Benoist C, and Mathis D. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* 2010;32: 815-827

Yaku A, Hashimoto M, Furu M, Ito H, Yamakawa N, Yamamoto W, Fujii T, Matsuda F, Mimori T, and Terao C. Relationship between handedness and joint involvement in rheumatoid arthritis. *Scientific reports* 2016;6:

Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, and Rabie AB. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci* 2012;4: 64-68

Yao TC, Kuo ML, See LC, Ou LS, Lee WI, Chan CK, and Huang JL. RANTES and monocyte chemoattractant protein 1 as sensitive markers of disease activity in patients with juvenile rheumatoid arthritis: a six - year longitudinal study. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 2006;54: 2585-2593

Zarb GA. 1985. *Physiologie und pathologie des Kiefergelenks: Grundlagen und Praxis von Diagnose und Therapie* (Quintessenz).

Zhao X, Okeke NL, Sharpe O, Batliwalla FM, Lee AT, Ho PP, Tomooka BH, Gregersen PK, and Robinson WH. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008;10: R94

Zilles K, and Tillmann B. 2011. *Anatomie* (Springer-Verlag).

9. Danksagung

Von Herzen bedanke ich mich bei meiner Doktormutter, Prof. Dr. Lina Gölz, die mir den Start in die kieferorthopädische und wissenschaftliche Welt erst ermöglichte. Ein inspirierendes Vorbild sowohl in wissenschaftlicher, als auch in menschlicher Hinsicht. Sie beweist, dass Exzellenz, Moral und Erfolg in Einklang zu bringen sind.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meinem Chef, Prof. Dr. Andreas Jäger, ein außergewöhnlicher Arbeitgeber, dessen Mitarbeiter sich glücklich schätzen dürfen stets unterstützt und gefördert zu werden und sich auf den kompetenten Rat verlassen zu können.

Ich bin ebenfalls den medizinisch-technischen Assistenten des Zentrums für Zahn-, Mund,- und Kieferheilkunde, insbesondere Frau Silke van Dyck, sehr dankbar für die Einführung in die Labortätigkeit und die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche, ohne die ich einige Deadlines verpasst hätte.

Mein liebevollster Dank gebührt meinem Ehemann Dr. Dr. Ali-Farid Safi, dem engagiertesten, motiviertesten und talentiertesten Wissenschaftler, den ich kenne. Seine ehrliche Hingabe und Begeisterung für die Forschung wirken ansteckend auf weit mehr Menschen als nur mich.

10. Veröffentlichungen

Februar 2018

Eingereichtes Manuskript (aktuell „under revision“)

„Comparative Study on Serum-Induced Arthritis in the temporomandibular and limb joint of mice“ im International Journal of Rheumatic Diseases iF 2.624

Sema Safi, David Frommholz, Susanne Reimann, Werner Götz, Christoph Bourauel, Anna-Lena Neumann, Achim Hoerauf, Harald Ilges, Ali-Farid Safi, Andreas Jäger, Marc P. Hübner*, Lina Gölz*

Oktober 2017

Preisträgerin der 90. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kieferorthopädie für das beste Poster der Kategorie „Interdisziplinäre Kieferorthopädie“

„Vergleichsstudie zur Serum-induzierten Arthritis im Fuß- und Kiefergelenk der Maus“

S. Deniz, D. Frommholz, S. Reimann, W. Götz, C. Bourauel, A. Hoerauf, R. Bräuer, M. Gajda, H. Illges, A. Jäger, M.P. Hübner, L. Gölz (Bonn, Rheinbach, Jena)

Januar 2018

Vortrag auf der Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Grundlagenforschung

„Vergleichsstudie zur Serum-induzierten Arthritis im Extremitäten- und Kiefergelenk der Maus: eine Pilotstudie „

Sema Safi, David Frommholz, Susanne Reimann, Werner Götz, Christoph Bourauel, Achim Hörauf, Harald Illges, Andreas Jäger, Marc Hübner, Lina Gölz