

Das Migrationspotential humaner rheumatoider Fibroblasten im SCID-Maus-Modell

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Christoph Tennie
aus Remscheid

Gießen 2010

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin mit Schwerpunkt für Rheumatologie
des

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. U. Müller-Ladner

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Müller-Ladner

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Hackstein

Tag der Disputation: 22.06.2010

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
1.	Das Krankheitsbild der Rheumatoiden Arthritis.....	1
1.1	Epidemiologie	3
1.2	Das klinische Bild der RA	3
1.3	Komplikationen	4
1.4	Diagnosestellung	4
1.5	Verlauf und Prognose	6
1.6	Therapie	7
1.7	Ätiologie und Pathogenese.....	8
1.8	Zytokine in der RA	9
2.	Die Rolle der synovialen Fibroblasten in der RA.....	11
2.1	Enzymatische Destruktion der extrazellulären Matrix durch SF	13
2.2	Das SCID-Maus-Modell	13
2.3	Das Migrationspotenzial der RASF.....	15
2.4	Die <i>inverse-wrap</i> -Methode	16
2.5	Migrationspotenzial von RASF im SCID-Maus-Modell	17
II	FRAGESTELLUNG	19
III	MATERIAL UND METHODEN	21
1.	Material	21
1.1	Chemikalien und Materialien	21
1.2	Zellen und Gewebe	22
1.3	Antikörper	23
1.4	Für die Entwicklung der immunhistochemischen Präparate verwendete Reagenzien	24
1.5	Geräte	24
2.	Methoden	25
2.1	Zellbiologische Methoden.....	25
2.1.1	Ursprung der Versuchszellen.....	25
2.1.2	Isolierung der Fibroblasten aus Synovialgewebe.....	25
2.1.3	Zellkultur	26
2.1.4	Passagieren der Zellen.....	26
2.1.5	Einfrieren der Zellen	27
2.1.6	Auftauen der Zellen	27
2.1.7	Bestimmen der Zellzahl	27

2.2 Das SCID-Maus-Modell der RA.....	28
2.2.1 Ursprung der Versuchstiere	28
2.2.2 Implantierung unter die Haut.....	28
2.2.3 Injektion der RASF in die Versuchstiere	29
2.2.4 Entnahme der Implantate sowie der Mausorgane	29
2.2.5 Dokumentation und Scoring der Implantate.....	30
2.2.6 Übersicht über die Versuchsserien	31
2.3 Histologische Methoden	31
2.3.1 Anfertigung von Gewebsschnitten	31
2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H/E-Färbung).....	32
2.3.3 Immunhistochemie.....	33
2.3.4 Immunzytochemie (Entwicklung mittels AEC Substrat-Kit).....	34
2.4 Dokumentation und Scoring der Mausorgane	35
IV ERGEBNISSE	36
1. Immunhistochemische Untersuchung der Organe	36
1.1 Dünndarm.....	37
1.2 Herzmuskel	39
1.3 Leber	40
1.4 Lunge	41
1.5 Niere.....	42
1.6 Lymphknoten.....	43
1.7 Milz	44
1.8 Haut in Entfernung zum Implantat	45
1.9 Haut in unmittelbarer Nähe des Implantats	46
1.10 Ohr/Ohrknorpel.....	47
1.11 Gelenk/Zeh.....	49
2. Zellfunde im Blut	51
V DISKUSSION	54
1. Detektion von RASF in murinen Organen.....	56
1.1 Dünndarm.....	57
1.2 Herzmuskel, Leber, Lunge	57
1.3 Niere	59
1.4 Milz, Lymphknoten.....	59
1.5 Subkutane Hautproben.....	61
1.6 Murine Gelenke und Ohrknorpel.....	62

2. Fibroblastenfunde in Blutproben	64
3. Interpretation der nachgewiesenen RASF in den Organen.....	65
4. Ausblicke.....	67
 VI ZUSAMMENFASSUNG	 69
 VII SUMMARY	 71
 VIII LITERATURVERZEICHNIS	 73

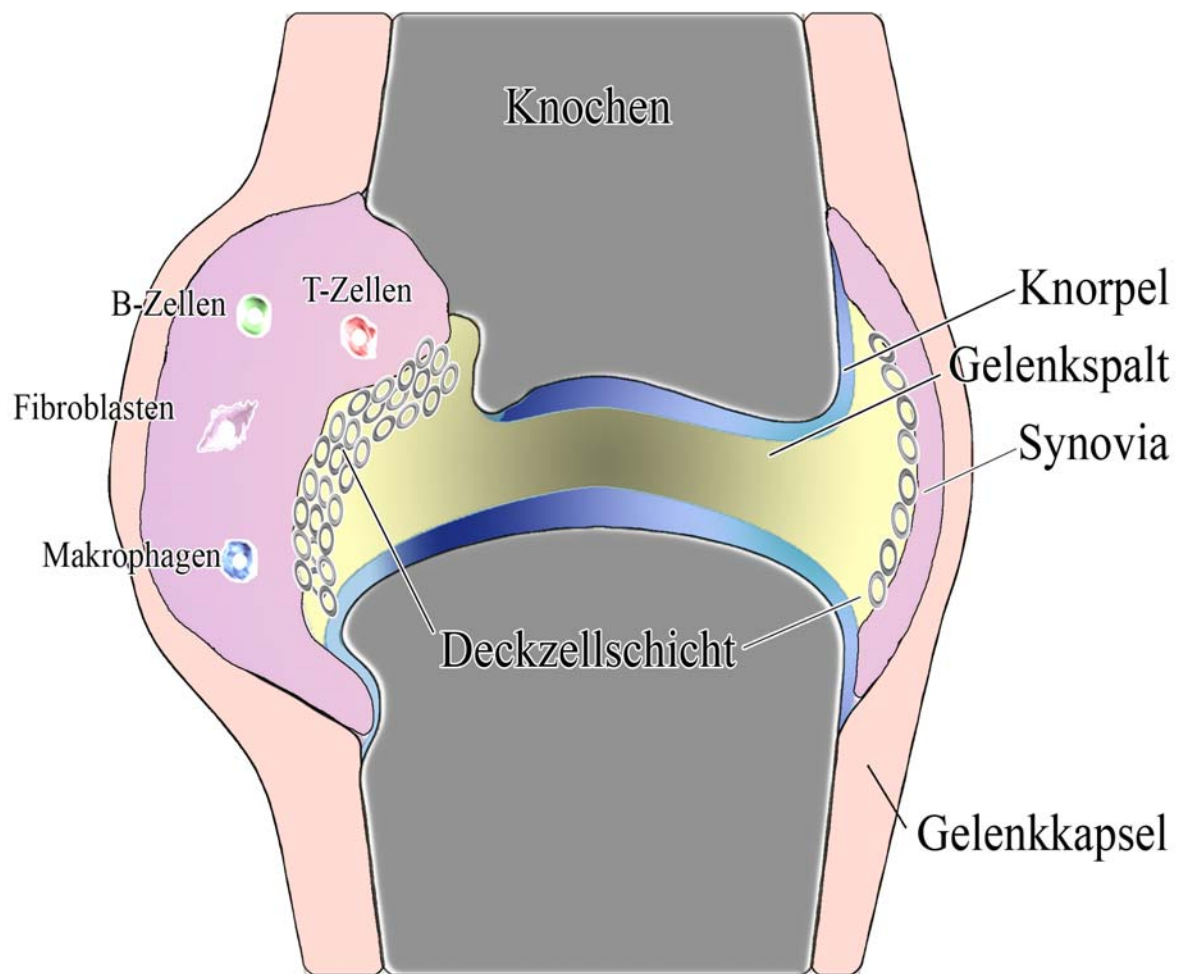
I EINLEITUNG

1. Das Krankheitsbild der Rheumatoiden Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) gehört zusammen mit den Spondarthritiden zu der Untergruppe der entzündlichen Arthritiden. Die RA und die Spondarthritiden gehören wiederum neben z.B. den Kollagenosen den entzündlich-rheumatischen Krankheitsbildern an (Gross WL, 2004).

Im vergangenen Jahrhundert wurde durch Veränderungen in Lebensführung und Hygiene in den Industrienationen der Fokus von den infektiösen Krankheiten weg hin zu den Krankheiten mit autoimmunem Hintergrund verlagert. Es ist jedoch unklar, ob diese Tendenz einem wirklichen Anstieg der Autoimmunkrankheiten oder einer erhöhten Aufmerksamkeit und verbesserten Diagnoseinstrumentarien zuzuschreiben ist (Zinkernagel RM, et al., 2001).

Als Ursache für die RA wird allgemein vermutet, dass diese sich aus einer variablen Zusammensetzung von individueller genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren, aber auch infektiösen Auslösern und fehlregulierten Immunantworten zusammensetzt (Ermann J et al., 2001; Marrack P et al., 2001; Smith JB, 2002; Silman AJ et al., 2002). Die durch ein entzündliches Geschehen verstärkte Zerstörung von Gelenken ist das einzigartige und hervorstechende Merkmal der RA, welches nicht nur die RA von anderen arthritischen Zuständen unterscheidet, sondern auch für die Prognose der meisten Betroffenen entscheidend ist (Gay S et al., 1993). Weit verbreitet ist die Theorie, die als erstes Ereignis in der Entstehung der RA eine antigenabhängige Aktivierung von T-Zellen vermutet. Die Aktivierung der T-Zellen führt im Anschluss unter anderem zur Proliferation synovialer Grenz- und Endothelzellen, Rekrutierung und Aktivierung zusätzlicher Entzündungszellen aus Knochenmark und Kreislauf und schließlich Ausschüttung von Zytokinen und Proteasen durch Makrophagen und fibroblastartige Synovialzellen. Daher findet im Verlaufe der RA eine Umorganisation der Gelenkhaut hin zu einem invasiven, pannusartigen Gewebe statt (siehe Abbildung 1). Dieser Prozess kann bis zur Zerstörung des Knochens führen, wenn ihm nicht Einhalt geboten wird (Harris ED et al. 2006).



Quelle: eigene Darstellung

Abbildung 1:

Das arthritische Gelenk: In der rechten Bildhälfte ist ein gesundes und intaktes Gelenk dargestellt. Die mit Knorpel überzogene Gelenkfläche der gelenkbildenden Knochen wird von der Gelenkinnenhaut (Synovium) umkleidet. Die von der Gelenkinnenhaut gebildete Gelenkflüssigkeit (Synovia) dient als Gelenkschmiere zur Verringerung des Reibungswiderstandes.

In der linken Bildhälfte ist das rheumatische Gelenk abgebildet. Die Gelenkinnenhaut ist entzündet und stark geschwollen. Abwehrzellen wie B- und T-Zellen und Makrophagen sind eingewandert. Aus der Gelenkinnenhaut hat sich ein sich in die Gelenkhöhle vordringendes Gewebe, der sog. „Pannus“ gebildet. Dieser breitet sich auf die Gelenkflächen aus und greift Knorpel- und Knochenstrukturen an.

1. 1.1 Epidemiologie

Die weltweite Prävalenz der RA beträgt im Schnitt 1 % bei Kaukasiern, variiert aber zwischen 0,1% bei afrikanischer Landbevölkerung und 5% bei Pima- und Chipewainindianern (Spector TD et al., 1990). Andere Studien geben eine Prävalenz der RA von 500/100000 Einwohnern in Nordeuropa, von 330/100000 in Südeuropa sowie von 350/100000 Einwohnern in den Entwicklungsländern an. In den Vereinigten Staaten lässt sich die Prävalenz auf etwa 1070/100000 beziffern (Alamanos Y et al., 2006). In der Geschlechtsverteilung der RA zeigen sich deutliche Unterschiede. In den Lebensjahren zwischen 20 und 50 liegt das Verhältnis erkrankter Frauen zu Männern bei 3:1. Sowohl weibliches Geschlecht als auch Alter sind für die Erkrankung wie auch für die Prognose als Risikofaktoren anzusehen (Symmons DP et al., 2002). Die RA stellt für die Volkswirtschaft durch die sie begleitenden Krankheitskosten und Produktivitätseinschränkungen einen wichtigen Kostenpunkt dar. Im Jahr 2005 lagen beispielsweise die Behandlungskosten der RA in den Vereinigten Staaten bei Arbeitern durch Behandlungsausgaben, Abwesenheit vom Arbeitsplatz und Kurzzeitbehinderungen auf dem vierten Rang mit 2300 US-Dollar durchschnittlichen Kosten pro Jahr (Ozminkowski RJ et al., 2006). Damit liegt die RA vor anderen chronischen Krankheiten wie z.B. Krebs, Asthma, bipolaren Störungen, Diabetes, chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen, Depression, Nierenversagen, Bluthochdruck und Herzerkrankungen.

1.2 Das klinische Bild der RA

Das Hauptkennzeichen der RA ist die bilaterale, symmetrische Polyarthrit. Charakteristischerweise sind beide Handgelenke und die zweiten und dritten Metakarpophalangealgelenke geschwollen und schmerzhaft. Größere Gelenke, wie Knie-, Hüft-, Fuß- und Ellenbogengelenk werden eventuell im Rahmen des Krankheitsprozesses betroffen. Ist jedoch nur ein Gelenk erkrankt, müssen andere Ursachen in Betracht gezogen werden, wie z.B. eine infektiöse Arthritis. Beschwerden wie allgemeines Unwohlsein, Schwäche, leicht erhöhte Temperatur, Schweißausbrüche und Gewichtsverlust sind, insbesondere zu Beginn der Erkrankung, häufige Begleiterscheinungen der RA. Viele Patienten leiden zudem an Depression. Persistierende Steifigkeit nach

dem Aufstehen in und in der Umgebung von Gelenken stellt ein einheitliches Symptom dar. Diese Art von Morgensteifigkeit dauert bis zu mehreren Stunden, kann sich mittags verbessern, um oftmals am späten Nachmittag oder Abend zurückzukehren. Systemische Manifestationen können zu Anfang Gelenkschmerzen und allgemein erhöhte Schmerzempfindlichkeit, welche ebenfalls zu den Symptomen einer Synovitis gehören, verschleiern (Zwafiler NJ, 2006).

1.3 Komplikationen

Die RA wird von zahlreichen Komplikationen begleitet. Diese werden für gewöhnlich nach den betroffenen Organen eingeteilt (z.B. Herz, Lunge etc.), können aber auch nach ihren pathophysiologischen Aspekten unterteilt werden. Einige davon sind lediglich Auswirkungen der die Gelenke betreffenden Prozesse. Beispiele hierfür sind die Kompressions-Neuropathien (Karpal- oder Tarsaltunnelsyndrome), Einklemmungen des Spinalstrangs (atlantoaxiale Dissoziation), synoviale Ausstülpungen (Baker-Zyste, Pseudothrombophlebitis) oder Sehnenrupturen. Andere, wie z.B. Anämie, Muskelschwäche, Osteopenie und Amyloidablagerungen, sind Folgeerscheinungen chronischer Entzündung und anhaltender Exposition gegenüber schädlichen Zytokinen. Äquivalente der Synovitis an anderen serösen Oberflächen stellen Pleuritiden oder Perikarditiden dar. Die Mehrzahl der Nebeneffekte kann immunologischen Phänomenen zugeschrieben werden (Zwafiler NJ, 2006).

1.4 Diagnosestellung

Die Diagnosestellung der RA erfolgt mit Hilfe einer weiten Bandbreite von diagnostischen Techniken und Werkzeugen. Als klinische Tests sind hierbei die standardisierte Bestimmung der Griffstärke und modifizierte Gelenkindizes zu nennen. In der Bildgebung liefern Computertomographie und Magnetresonanztomographie klinisch wichtige Informationen über Gelenkintegrität und Entzündungsumfang mit einer beträchtlich höheren Sensitivität und Auflösung als der konventioneller Techniken. Die labormedizinische Diagnostik umfasst die Bestimmung der Entzündungsaktivität (z.B. C-reaktives Protein, BSG), von Rheumafaktoren, Immunkomplexen, Komplementrezeptoren sowie Produkten der Komplementaktivierung, Interleukinen und vielem

mehr (Panush RS, 1992). Zusätzlich werden die von Arnett et al. 1988 erarbeiteten Kriterien des *American College of Rheumatology* (ACR) herangezogen:

1. Morgensteifigkeit der Gelenke von mindestens einer Stunde Dauer
2. Arthritis von 3 oder mehr Gelenkbereichen: Weichteilschwellung und Erguss gleichzeitig an mindestens 3 Gelenkbereichen
3. Arthritis der Hand- und Fingergelenke: Schmerzen und Schwellung von Handwurzelgelenken, proximalen Interphalangealgelenken oder Metakarpophalangealgelenken (siehe Abbildung 2)
4. Symmetrische Arthritis: Gleichzeitiger Befall desselben Gelenkbereiches beider Körperhälften
5. Rheumaknoten: Subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen oder Extensorflächen oder im juxtaartikulären Bereich
6. Nachweis von Rheumafaktoren im Serum
7. Typische Röntgenveränderungen der Hände: Gelenknahe Osteoporose u./o. Erosionen. Rein osteoarthrotische Veränderungen sind hierfür nicht ausreichend

Ein Patient leidet an einer RA, wenn er 4 von 7 Kriterien erfüllt (ACR-Score ≥ 4 bei RA). Die Kriterien der RA müssen für mindestens eine Woche vorliegen.



Abbildung 2: Gelenkveränderungen bei RA

Durch Knorpelverlust ist der Gelenkspalt verschmälert (s. Pfeile). Es finden sich gelenknahe Knochenerosionen sowie ein Abweichen der Finger in Richtung Kleinfinger (sog. Ulnardeviation).

Quelle: <http://www.arthritis.ch/images/abb2.jpg>,
aufgerufen am 10.12.2009

Erklärungsversuche für die „natürliche Ursache“ der RA (insbesondere in Abwesenheit einer effektiven Therapie) basieren auf Beobachtungen, die bereits vor 1950 gemacht wurden. In dieser Zeit waren serologische Tests für Rheumafaktoren, genetische Analysen und weiterentwickelte Bildgebungstechniken noch nicht verfügbar. Es existierte noch keine universelle Übereinkunft für die Klassifikation der entzündlichen Polyarthrititis.

Merkmale, die auf eine günstige oder ungünstige Prognose hindeuten, konnten jedoch schon frühzeitig identifiziert werden (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Klinische und labormedizinische Parameter für eine ungünstige Prognose der RA (Zwaifler NJ et al. „Rheumatoid Arthritis“, 2nd Edition, 2006)

Klinik	Labor
Hohe Anzahl entzündeter Gelenke (>14)	Erhöhte Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) oder C-reaktives Protein (CRP)
Extraartikuläre Manifestationen	Hoher Titer Rheumafaktor (IgM)
Rheumaknoten	RA-„Prädispositions“- Haplotyp
Chronisches Krankheitsgeschehen	Juxtaartikuläre Knochenerosionen

1.5 Verlauf und Prognose

Remissionen ereignen sich selten nach dem ersten Krankheitsjahr. Männer weisen hier eine bessere Prognose auf, insbesondere junge Frauen zeigen selten eine Remission. Mehr als die Hälfte der Patientinnen, die schwanger werden, erleben im Allgemeinen eine Besserung der Symptomatik, die Synovitis kehrt jedoch zwei bis drei Monate *post partum* zurück. Beginnt die Krankheit nach dem 50. Lebensjahr, hat sie eine bessere Prognose. Grundsätzlich gilt, dass sich die weitere Entwicklung verschlechtert, je länger eine fortschreitende Erkrankung besteht. Eine verkomplizierende Vaskulitis ist mit einer besonders ernsten Prognose verbunden. Patienten versterben selten an einer RA, obwohl eine sekundäre systemische Vaskulitis oder eine atlantookzipitale Subluxation letal enden kann (Zwaifler NJ, 2006).

1.6 Therapie

Für die RA gibt es keine kausale Therapie. Die Behandlungsstrategie zielt darauf ab, den Entzündungsprozess zu stoppen und damit Schmerz, Bewegungseinschränkungen und vor allem die Gelenkzerstörung zu verhindern. Nach Diagnosestellung wird zunächst medikamentös mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) und Glucocorticoiden behandelt, bis die in Kombination applizierte, langsamer wirkende sogenannte „Basistherapie“ greift. Diese Basistherapie mit Antirheumatika (DMARD = *Disease-Modifying Antirheumatic Drugs*) kann den gelenkzerstörenden Prozess verlangsamen, manchmal sogar stoppen. Zu beachten ist hierbei, dass NSAR keinen Einfluss auf die Prognose bewirken sondern nur zu einer Symptomreduktion führen können (Landewé RB et al., 2002; Van Jaarsveld CH et al., 2000). Zu Beginn bei nur leichten Beschwerden werden Sulfasalazin, seltener Antimalariamittel (Chloroquin, Hydroxychloroquin) oder auch orales Gold eingesetzt. Bei aktivem Beginn der RA ist Methotrexat das Mittel der Wahl. Therapierefraktäre Patienten werden mit sogenannten Biologika, wie z.B. Tumornekrosefaktor- α –Blockern ((TNF- α)-Blockern) oder mit Anti-CD20-Antikörpern bzw. Anti-IL-6R-Antikörpern behandelt.

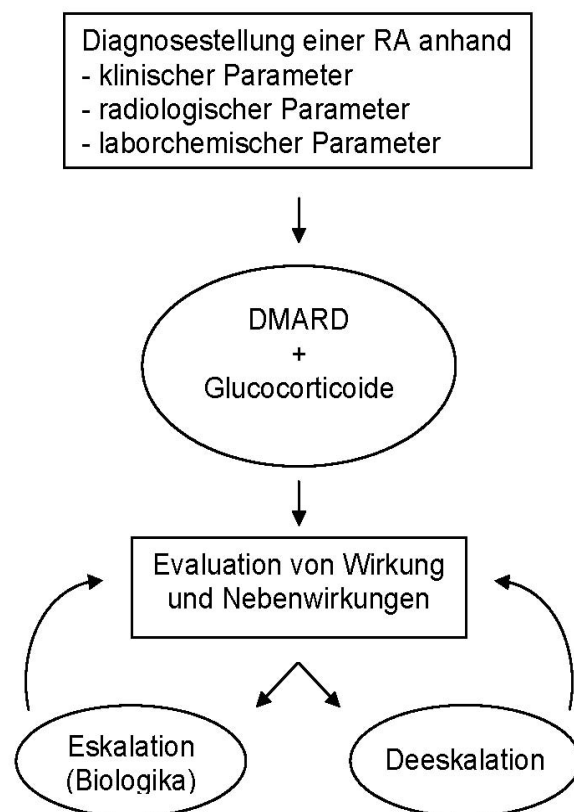


Abbildung 3: Medikamentöse Therapie der RA

Quelle: eigene Darstellung

Bei schweren systemischen Manifestationen z.B. im Rahmen einer systemischen Vaskulitis wird Cyclophosphamid verwendet (Gross WL, 2004). Von entscheidender Bedeutung ist ein frühzeitiger Therapiebeginn mit Glucocorticoiden und DMARD. Dieser führt erwiesenermaßen zu einer Senkung der Mortalität und des Krankheitsprozesses (Mäkinen et al., 2007). Begleitend sind punktuelle physikalische, physiotherapeutische und ergotherapeutische Maßnahmen hilfreich. Ein frühzeitiger Kontakt mit einem in der Rheumachirurgie erfahrenen orthopädisch und handchirurgisch operativ tätigen Spezialisten zur Erhaltung von Gelenkfunktion und damit Selbständigkeit und Mobilität ist ebenfalls erforderlich (Frey D et al., 1997).

Die beiden bei der RA entscheidenden Prozesse, die chronisch entzündliche Veränderung des Synoviums, an der unter anderem T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen beteiligt sind, wie auch die fortschreitende Zerstörung des Gelenkknorpels und -knochens durch Fibroblasten und Osteoklasten bilden die Hauptansatzpunkte einer wirksamen Therapie.

Neue Medikamente zielen hierbei beispielsweise auf die T-Zell-unterstützte Entzündung ab. Die Entwicklung dieser Wirkstoffe basiert auf einer zunehmenden Zahl von Daten, welche die Rolle der T-Zellen bei der Pathogenese der RA hervorhebt (Lipsky PE, 1998; Kotzin BL, 1998). Durch die Entwicklung des Ko-Stimulationshemmers Abatazept (Orencia®) steht ein weiteres immunmodulatorisches Medikament zur Verfügung. Andere neue Therapien richten sich gegen Moleküle, durch welche die Gewebszerstörung hervorgerufen wird. Diese Herangehensweisen, allgemein Antizytokinthérapien genannt, basieren auf der Inhibierung proinflammatorischer Zytokine. Die Antizytokinthérapie der RA ist effektiv, gut verfügbar und wird in steigender Zahl angewandt. Die Inhibition von TNF- α entweder durch einen rekombinanten löslichen TNF- α -Rezeptor (Eubrel®) oder monoklonale Antikörper wie Infliximab (Remicade®, Humira®, Cimzia® und Simponi®), welche mit TNF- α eine Bindung eingehen und dessen Funktion als Entzündungsmediator inhibieren, mündet in einer objektiven und subjektiven Verbesserung der RA. Im Vergleich unterscheiden sich die TNF- α -Hemmer hinsichtlich Sicherheit und Effektivität nicht signifikant (Gartlehner G et al., 2006). Vorläufigen Studien folgend hat sich ein rekombinanter IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra, Anakinra), der an den IL-1-Rezeptor auf z.B. Monozyten bindet, ohne diesen zu aktivieren, als ebenso effektiv erwiesen (Smith JB et al., 2002). Die Therapie der RA mit Biologika ist jedoch in einigen Fällen mit ernststen Nebenwirkungen ver-

bunden. Ca. 30 % der Patienten sprechen auch nicht auf die Therapieansätze an, wobei die Gründe hierfür noch nicht vollständig geklärt sind (Kiely W et al. 2002).

1.7 Ätiologie und Pathogenese

Obwohl vieles im Verlauf der RA auf eine zugrunde liegende infektiöse Ursache hinweist, konnte trotz vieler Anstrengungen noch kein infektiöses Agens nachgewiesen werden. Es ist wahrscheinlich, dass zahlreiche verschiedene Faktoren in einem immunogenetisch prädisponierten Individuum interagieren, um eine polyartikuläre Synovitis auszulösen. Einmal gestartet, wird der Prozess dabei letzten Endes selbsterhaltend (Harris D et al., 2006).

Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche Konzepte und Spekulationen die Ätiopathogenese der RA betreffend in den Raum gestellt, von denen die meisten sowohl genetische als auch Umweltfaktoren beinhalten. Bekannt ist eine Assoziation der Krankheit mit bestimmten HLA-DRB1-Allelen, welche für eine bekannte Sequenz von fünf Aminosäuren in der hypervariablen Region der HLA-DR- β -Kette kodieren, das sogenannte *susceptibility epitope* oder *shared epitope*. Dieses Epitop wird bei 80-90 % aller kaukasischen Patienten mit RA vorgefunden. Somit liegt seine Häufigkeit deutlich höher als bei der Normalbevölkerung (40-50 %). Die Schätzungen bezüglich der Erblichkeit beziffern sich auf 60 %, davon werden dem HLA-Status weniger als die Hälfte zugeschrieben, multiple Loci außerhalb der HLA-Region tragen möglicherweise ebenfalls zu einem erhöhten familiären Risiko bei. Am weitesten verbreitet ist die Annahme, dass das *shared epitope* die Bindung von HLA-DR-Molekülen an arthritogene Peptide vermittelt. Unter den Umweltfaktoren bilden Infektionen und Mikroben eine der häufigsten Alternativen. Jedoch konnten im Rahmen intensiver Studien der letzten Jahre nur wenig belastbare Hinweise erbracht werden, welche die Hypothese einer mikrobiellen Beteiligung bei der Pathogenese der RA stützen (Zwaifler NJ, 2006).

Monozygote Zwillinge zeigen für die Entwicklung einer RA eine Konkordanzrate von nur 15-30 % auf. Diese Beobachtung lässt nicht nur Raum für Erwägungen somatischer Diversifikation, sondern auch für Umweltfaktoren. Die bakterielle Besiedelung des Darmes durch potenziell rheumatogene Erreger ist auch zu berücksichtigen. Andererseits steigt die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen im Rahmen eines

Follow-Up über 30 Jahre von dem Tag, ab dem ein Zwilling an RA erkrankt ist, auf ca. 40 % an (Toivanen P, 2006).

Wie bereits angeführt weisen Frauen gegenüber Männern eine drei- bis vierfach erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit auf. Dies beruht möglicherweise auf stimulativen Wirkungen des Östrogens auf das Immunsystem, da Östrogen die T-Suppressorzell-Funktion hemmt und die T-Helfer-Funktion verstärkt (Ansa A et al., 1985). Zusätzlich konnten Östrogen-Rezeptoren auf Synovialzellen und T-Suppressorzellen nachgewiesen werden (Takagi H et al., 2000).

1.8 Zytokine in der RA

Im Sinne eines besseren Verständnisses der Funktionen von verschiedenen Zytokinen in der Pathophysiologie der Gelenkentzündung und Destruktion wurden die in der rheumatoiden Synovialflüssigkeit gefundenen oder peripher im Blut durch mononukleäre Zellen produzierten Zytokine in zahlreichen Studien charakterisiert. Vereinfachend lassen sich die an der RA beteiligten Zytokine in pro- und antiinflammatorisch unterscheiden (Feldmann M et al., 1996).

Allerdings kann diese Unterscheidung nicht scharf gezogen werden, da zahlreiche Zytokine sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken können. Von großer Wichtigkeit sind die Muster der Zytokinausschüttung, die durch Zellen des synovialen Gewebes erfolgen. Dies rührt daher, dass die Schäden, die an Knorpel, Knochen und periartikulären Strukturen entstehen, primär durch Zellen des proliferierenden Synoviums und des angrenzenden Knorpels vermittelt werden. Die zentralen Zytokine sind die u.a. durch Makrophagen und Fibroblasten produzierten IL-6, IL-1 β , TNF- α , GM-CSF und TGF- β , während Interferon- γ nur in geringem Umfang nachgewiesen werden konnte.

Studien in experimentellen Modellen zeigen, dass TNF- α ein Schlüsselzytokin für die Gelenkzerstörung ist und IL-1 β ist vor allem in die Knorpelzerstörung involviert. Die IL-1 β Produktion kann unabhängig von TNF- α erfolgen (van den Berg WB, 1999). Unter Verwendung von anti-TNF- α /IL-1 β neutralisierenden Antikörpern konnten diese Beobachtungen von Arthritis-Modellen in *Knockout*-Mäusen weiter unterstützt werden. Im Unterschied zur absoluten IL-1 β -Konzentration wird das destruktive Potenzial einer Arthritis durch die Balance von regulativen Zytokinen und Wachstumsfaktoren bestimmt.

2. Die Rolle der synovialen Fibroblasten in der RA

Obwohl es in den letzten Jahren deutliche Fortschritte in der Erforschung der Ätiologie und Pathogenese gegeben hat, sind diese noch nicht vollständig verstanden (Ziff M, 1990). Es herrscht weitgehende Übereinstimmung über die Tatsache, dass die Pathogenese der RA durch die Aktion und Interaktion mehrerer Zelltypen und Faktoren vermittelt wird. Die hochspezifische Kommunikation der beteiligten Zellen bringt dabei die große Vielfalt an Symptomen und Merkmalen der RA hervor. Basierend auf dieser Erkenntnis wurde die ursprüngliche Theorie aktiver Signalgeber und passiv reagierender Zellen verlassen. An ihre Stelle trat die Einsicht, dass in der Pathogenese der RA viele verschiedene Zelltypen aktiv in das Krankheitsgeschehen eingebunden sind (Firestein GS, 1996). So wurde die RA zunächst noch durch eine chronische Entzündung der Gelenksynovia und Infiltration durch aktivierte blutständige Zellen, hauptsächlich CD4-positive T-Zellen, Makrophagen sowie Plasmazellen charakterisiert (Jannossy G et al., 1981). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass in diesem Prozess zusätzlich ein aktivierter IL-1-Rezeptor, sowohl in initiierender als auch unterhaltender Funktion, eine wichtige Rolle spielt (Franz JK et al., 1999). Der Fibroblasten-Nomenklatur folgend, sind synoviale Fibroblasten (SF) als nicht-vaskuläre, nicht-epitheliale Zellen definiert, welche während der Embryogenese durch Teilung im Synovium lokal entstehen, durch Teilung ersetzt werden und fibröse Matrix-Proteine und Matrix bilden. Fibroblasten des Synoviums sind auch bekannt als „Fibroblast-artige“- oder „Typ B“-Synoviozyten/synoviale Zellen. In der Gewebeskultur sind intimale und subintimale Fibroblasten jedoch nicht unterscheidbar, weshalb der generelle Ausdruck „synovialer Fibroblast“ verwendet wird (Edwards J, 2000). Die Begriffe „intimal“ und „subintimal“ beziehen sich hier auf verschiedene Schichten der Synovia. Rheumatoide synoviale Fibroblasten (RASf) sind durch einen rundlichen, großen und abgeblassten Zellkern charakterisiert, der auf einen aktiven RNA-Metabolismus hindeutet. Wesentlich ist auch, dass RASf in der Zellkultur über mehrere Passagen vermehrt werden können. Diese Veränderungen werden oft auf eine tumorartige Transformation zurückgeführt, welche in dem aggressiven und invasiven Verhalten der RASf im angrenzenden Knorpel und Knochen resultiert (Huber LC et al., 2006). Heute ist bekannt, dass sich RASf in der obersten Schicht des Synoviums, der Deckzellschicht oder des *lining layer*, substanziiell nicht nur von anderen SF in nor-

malem Gewebe, sondern auch von RASF in tieferen Schichten des rheumatoiden Synoviums unterscheiden (Pap T et al., 2000).

Diese Unterschiede scheinen für die RA charakteristisch zu sein und sind sowohl in der Morphologie als auch in biologischen Besonderheiten zu finden. So weisen RASF in der Deckzellschicht zahlreiche Merkmale der Zellaktivierung auf, die letztendlich in ihrem aggressiven und invasiven Verhalten münden. Ein wichtiges Merkmal hierbei ist die Fähigkeit aktivierter RASF an Gelenkknorpel zu adhären und tief in die extrazelluläre Matrix (EZM) einzudringen, um dort einen unkontrollierten Zerstörungsprozess zu unterhalten (Pap T et al., 2000).

Der Einfluss der SF bezüglich des Prozesses der Gelenkzerstörung in der RA ist bis heute noch nicht völlig klar (Müller-Ladner U et al., 2005; Kontoyiannis D et al., 2000). Allerdings wurde die Vorstellung, die RA sei eine primär T-Zell-abhängige Erkrankung, im Verlauf der letzten Jahre zunehmend in Frage gestellt. Vielmehr wächst die Erkenntnis, dass bei der Entstehung der RA residente, fibroblastartige Zellen einen signifikanten Beitrag zur Progredienz der Erkrankung leisten (Huber LC et al., 2006). Jüngste Forschungsergebnisse deuten auf die zentrale Rolle der RASF bei der Knorpeldestruktion hin (Müller-Ladner et al., 2007). Hierbei sei auf die klassische Funktion der SF, mit der extrazellulären Knorpelmatrix zu interagieren und z.B. durch Initiierung bei Wundheilung deren Degradation durch Produktion von Metalloproteinasen und Cathepsinen herbeizuführen, hingewiesen. Die Zerstörung von Matrix und Matrixproteinen scheint sich jedoch auch autonom ohne die Anwesenheit von Immunzellen zu vollziehen (Müller-Ladner U et al., 1996). Es ist wahrscheinlich, dass SF, ähnlich wie Zellen des Knochenmarkstromas, in der Lage sind, die effektorischen Eigenschaften residenter oder aus dem Blut eingewanderter Zellen im arthritischen Gelenk zu modulieren. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass intimale SF normalerweise nur in minimalem Kontakt zu Blutzellen, wie Makrophagen oder Lymphozyten, stehen. Topographische Isolation könnte demzufolge einen Schutz gegenüber SF-immunen Zellinteraktionen gewährleisten. In einem von RA betroffenen Gelenk sind dagegen sowohl die Lokalisation als auch die Interaktionen synovialer Fibroblasten mit Leukozyten verändert, welche sowohl die Entwicklung effektorischer Funktionen als auch pathogener Entzündung begünstigen (Tanner IH et al., 2003). Einmal aktiviert, produzieren die RASF eine Reihe von Zytokinen, Chemokinen und Matrix auflösenden Proteinen, welche Einfluss auf die benachbarten Entzündungs- und Endothelzellen nehmen und so in der Gesamtheit aller Prozesse die

fortschreitende Zerstörung von Knorpel- und Knochenstrukturen vorantreiben. Innerhalb dieses Prozesses sind die ausgeschütteten Zytokine im Synovium auch an der Rekrutierung von T-Zellen, Makrophagen und neutrophilen Leukozyten beteiligt, welche wiederum neue Entzündungszellen anziehen und nicht zuletzt die RASF und Osteoklasten zu vermehrter Zytokinbildung anregen (Turner IH et al., 2003).

2.1 Enzymatische Destruktion der extrazellulären Matrix durch SF

Die Degradation der extrazellulären Matrix in der RA vollzieht sich u.a. durch von Fibroblasten produzierte proteolytische Enzyme, insbesondere der Cathepsine und der Matrixmetalloproteinasen (MMP). Erhöhte Werte der MMP konnten nicht nur in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten gefunden werden, sondern auch im rheumatoiden Synovium (Pap T et al., 2000). Dabei konnten in der Grenzzellschicht oder an Orten der Knorpelinvasion RASF als Hauptquelle der MMP identifiziert werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Grade der Expression von MMP, wie z.B. des MMP-13, mit erhöhten Werten systemischer Entzündungsmarker korrelierten (Pap T et al., 2000).

Die MMP bilden eine Gruppe von 18 verschiedenen beim Menschen bekannten Enzymen. Die Gruppe umfasst die „klassische“ Fibroblasten-Kollagenase MMP-1 (Kollagenase-1), die mesenchymale Form der MMP-8 (Kollagenase-2) und MMP-13 (Kollagenase-3). MMP-8 war früher als neutrophile Kollagenase bekannt, bis gezeigt wurde, dass sie z.B. auch durch mit TNF- α stimulierten Fibroblasten produziert wird (Hanemaaijer R et al., 1997).

2.2 Das SCID-Maus-Modell

Ungeachtet neuer Therapieansätze bleibt bei vielen Patienten eine klinische Verbesserung ihres Zustandes aus, was darauf hindeutet, dass in der RA außer durch immunkompetente Lymphozyten (über TNF etc.) noch andere, Immunzell- und TNF-unabhängige Wege bei der Entzündung und Gelenkzerstörung existieren (Huber LC et al., 2006). Die destruktiven Eigenschaften der RASF scheinen nicht nur eine Antwort auf die kontinuierliche Stimulierung durch inflammatorische Mediatoren, sondern int-

rinsische Merkmale der RASF zu sein. Diese Beobachtung wurde hauptsächlich aus Studien im Rahmen des sog. *Severe-Combined-Immuno-Deficient (SCID)-mouse* - Koimplantationsmodells gewonnen (Müller-Ladner et al., 1996). Dieses Tiermodell wurde für die RA entwickelt, um verschiedene Aspekte eines betroffenen humanen Gelenkes unter kontrollierten Bedingungen *in vivo* zu studieren. Hierbei werden humane RASF und gesunder humaner Knorpel verschiedener Individuen zusammen mit einem inerten Gelatineschwamm unter die Nierenkapsel der SCID-Maus koimplantiert. Die SCID-Mäuse weisen schwere Defekte sowohl in der zellulären, als auch in der humoralen Immunantwort auf und sind demzufolge nicht in der Lage, die Implantate abzustößen. Sobald die Implantate entfernt werden, ist es sowohl möglich, die molekularen Mechanismen der Interaktionen zwischen synovialen Fibroblasten und humanem Knorpel zu untersuchen, als auch die Knorpeldestruktion histologisch nachzuweisen. Offensichtliche Vorzüge dieses Modells bestehen vor allem darin, dass sich beide Vorgänge in der Abwesenheit inflammatorischer Zellen oder Mediatoren abspielen und mit primärem humanen Knorpelmaterial gearbeitet wird.

In zwei abgewandelten SCID-Maus-Modellen für die Beobachtung der RA konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden (Pierer M et. al., 2003):

Im ersten Modell verblieben humanes, aus RA-Patienten gewonnenes Synovium und gesunder Knorpel von nicht an RA erkrankten Patienten für die Dauer von 304 Tagen als Implantat unter der Nierenkapsel von SCID-Mäusen. In Abwesenheit von humanen Blutbestandteilen zeigten sich nach 35 Tagen fokale Erosionen an Orten des Knorpels, an die sich das Synovialgewebe angelagert hatte. Nach 105 Tagen wurde eine Invasion aktivierter RASF in den Knorpel registriert. Die RASF produzierten hohe Mengen mRNA für matrixabbauende Enzyme. Der Fund einer Expression der Makrophagenmarker CD14 und CD68 in nur wenigen Zellen identifizierte die Mehrzahl der Zellen an der unmittelbaren Zone der Knorpelzerstörung als RASF. Im Gegensatz hierzu konnte bei Mäusen, denen anstatt rheumatoiden Synoviums Synovialgewebe von Patienten mit Osteoarthritis (OA) implantiert wurde, weder eine Knorpelinvasion noch die Produktion matrixdegradierender Enzyme nachgewiesen werden. Diese Unterschiede wurden mit einem objektiven Scoringssystem der visuell erfassbaren Fibroblasteninvasion in den Knorpel und der perichondrozytären Knorpel-degradation evaluiert (Judex M et al., 2001).

2.3 Das Migrationspotenzial der RASF

Die Beobachtungen im Tiermodell warfen die Frage auf, in welcher Weise die RASF an den gesunden humanen Knorpel adhäreren und dort ohne Stimuli durch andere beteiligte Immunzellen oder immunmodulatorisch wirksame Effektorenzyme ein aggressives Potenzial entwickeln.

Von Interesse war ebenso die Fragestellung, wodurch die über die Zeit beobachtbare lokale Migration der RASF und Adhäsion an und später in den humanen Knorpel bewirkt wird. Ältere Studien haben bereits die Chemotaxis zu und Adhäsion von humanen Fibroblasten an alle drei nativen humanen Kollagene und α -Fibrillen belegt (Postlethwaite AE, 1978). In diesen Untersuchungen wurde vermutet, dass durch Degradation und Umbau von Kollagen an Orten der Gewebsschädigung und Entzündung Peptide entstehen. Diese Peptide aus Kollagen- und Kollagenabbauprodukten fungieren als chemotaktische Stimuli für Fibroblasten und bewirken so indirekt die Reparatur beschädigten Gewebes. Schon lange ist bekannt, dass neben anderen Zellen Fibroblasten angezogen werden, sobald Gewebe immunologischen, mechanischen oder chemischen Schäden ausgesetzt ist (Kahler CM, 1996). Gewebsständige Fibroblasten migrieren an den Ort der Entzündung, proliferieren dort und synthetisieren und remodellieren eine neue Matrix. Es konnte gezeigt werden, dass das aus sensorischen Nervenendigungen freigesetzte Neuropeptid Sekretoneurin die selektive Migration humaner Hautfibroblasten vermittelt. Die Attraktion der Fibroblasten durch das Neuropeptid konnte durch spezifische Anti-Sekretoneurin-Antikörper unterbunden werden (Kahler CM, 1996). Insbesondere vor dem Hintergrund der sich klinisch von einer in der Mehrzahl der Fälle initial monoartikulär mit späterem polyartikulärem Befall entwickelnden RA stellte sich die Frage, ob bei der progredienten Ausbreitung der Krankheit das Migrationspotenzial der RASF über eine lokale gewebsständige Migration hinaus eine Rolle spielt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde in der Arbeitsgruppe, in der diese Dissertation entstand, das SCID-Maus-Modell als Hybridmodell, bestehend aus einem Versuchstier, humanem Gewebe und humanen autoreaktiven Zellen, in der Erforschung einer möglichen Migration der RASF eingesetzt. Um festzustellen, ob die RASF in der Lage sind, lokal gezielt in humanen Knorpel einzuwandern, wurde SCID-Mäusen humaner Knorpel in Verbindung mit RASF aus RA-Patienten mittels der sog. *inverse-wrap*-Methode subkutan in eine Flanke implantiert. Um zu untersuchen, ob RASF auch implantierten humanen Knor-

pel invadieren und destruieren können, wurde auf der gegenüberliegenden Flanke ebenfalls humaner Knorpel, diesmal ohne RASF implantiert. Zur Analyse eines möglichen Migrationsweges über den Blutkreislauf wurde in weiteren Maus-Serien zudem die Art der Zellgabe variiert: Einigen Tieren einer Serie wurden die RASF sofort lokal zu den humanen Knorpelimplantaten gegeben, während anderen die RASF nach Abheilung der Implantatswunden einige Wochen später über eine subkutane (sc), intra-peritoneale (ip) oder intravenöse (iv) Injektion verabreicht wurden. Durch die nachträgliche Injektion von RASF sollte zusätzlich der Einfluss muriner/humaner Wundheilungseffekte ausgeschlossen werden (Neumann E et al., 2004; Lefèvre S et al, 2009).

2.4 Die *inverse-wrap*-Methode

Die *inverse-wrap*-Methode ist eine Variante des SCID-Maus-Modells zur Implantation von RASF mit Knorpel-Implantaten (KI). Diese bestehen aus 3.5 mm³ großen Knorpelstücken, die zunächst zentral in einen inerten Gelatineschwamm (80-100 mm³) eingebettet werden. Darauf werden die KI in eine sterile Fibroblasten-Suspensionslösung (ca. 5×10^5 Zellen in steriler Kochsalzlösung) getränkt. Unter chirurgischer Eröffnung der Maushaut an der Flanke werden bis zu drei KI-Komplexe in das Versuchstier implantiert. Die Vorteile der *inverse-wrap*-Methode gegenüber einer vergleichbaren Technik der Implantation des alleinigen Knorpels bspw. unter die Nierenkapsel liegen in mehreren Punkten begründet. So bedeutet die Implantation des Versuchsmaterials in eine Subkutan tasche für den Operateur einen geringeren chirurgischen Aufwand und damit Zeitersparnis. Daneben stellt diese Technik für das Versuchstier einen deutlich weniger invasiven Eingriff dar. Dieser ist folglich auch mit einer geringen Narkosedosis sowie geringeren Infektionsrisiken für das Tier verbunden. Zudem ist der Knorpel später bei der Entnahme des Implantats wesentlich leichter aufzufinden. Im Gegensatz zu der Implantation unter die Nierenkapsel ist es bei der subkutanen Implantation möglich, erheblich mehr KI unter die Haut einzusetzen. Weiter lässt subkutane Implantation wesentlich größere KI und damit höhere Zellzahlen pro Implantat zu. Diese Vorteile führen bei einer längeren Versuchsreihe zu einer höheren Anzahl auswertbarer Implantate bei gleicher Tierzahl. Als problematisch anzusehen ist die größere Zone der Wundheilung in der Umgebung des Implantats.

Aus diesem Grund wurden bei den durchgeführten Versuchen die RASF erst nach einer Wundheilungsfrist von 14 Tagen den Versuchstieren zugegeben. Diese Verzögerung sollte den Einfluss der Wundheilung und der daran beteiligten reparativen und neoangiogenetischen Vorgänge durch Zellen, Zytokine etc. ausschließen (Judex M et al., 2001).

2.5 Migrationspotenzial von RASF im SCID-Maus-Modell

Die Migration der RASF mit anschließender Invasion und Degradation des implantierten Knorpels konnte im SCID-Maus-Modell nachgewiesen werden (Lefèvre S et al, 2009). Abbildung 4 zeigt ein Beispiel für die Invasion von RASF in Knorpel (rote Pfeile) mit gleichzeitiger perichondrozytärer Degradation (grüne Pfeile) bei einem primären Implantat, dem Knorpel und RASF gleichzeitig implantiert wurden. Für das kontralaterale Implantat auf der gegenüberliegenden Flanke desselben Tieres, bei dem Knorpel ohne RASF implantiert wurde, ist in Abbildung 5 ebenfalls eine ähnlich deutliche Invasion in den humanen Knorpel (rote Pfeile) und perichondrozytäre Degradation (grüne Pfeile) zu erkennen.

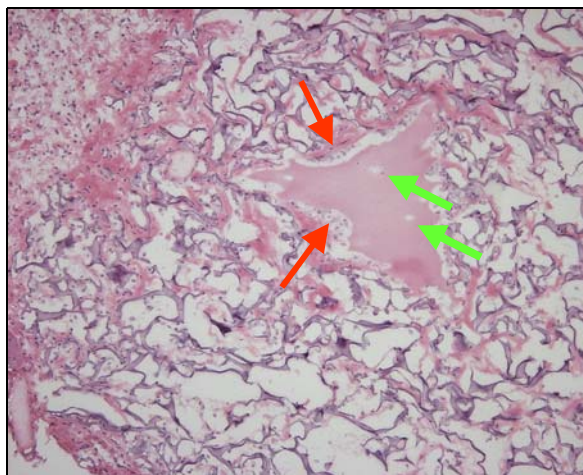


Abbildung 4: primäres Implantat eingebettet in Schwamm

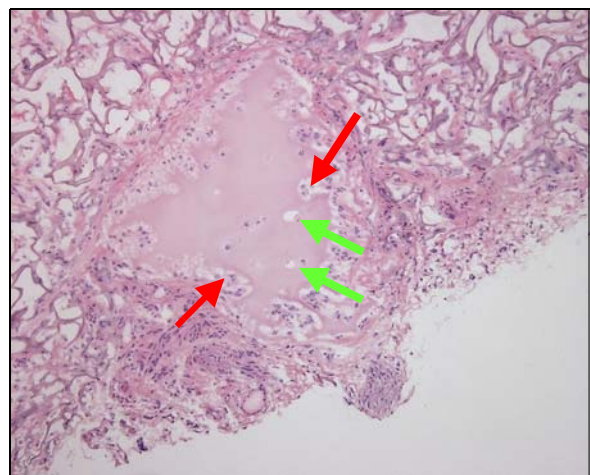


Abbildung 5: Gleiches Versuchstier kontralaterales Implantat

Ähnlich starke Invasion und Degradation konnte für die per Injektion applizierten Zellen und die zeitversetzte Implantation verzeichnet werden. Bei letztgenanntem An-

satz wurden zunächst beidseitig KI ohne Zellen implantiert. 14 Tage später wurden die RASF ip, iv bzw. sc injiziert.

Mit diesen Ergebnissen wurde die Migrationsfähigkeit der RASF unabhängig von Applikationsart oder Wundheilung eindeutig bewiesen (Neumann E et al., 2005). Der Nachweis der invadierenden humanen Zellen erfolgte immunhistochemisch mittels Überexpression von EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und Nachweis humaner Sequenzen in der *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Um den Migrationsweg über den Blutkreislauf zu analysieren, wurden nach Ablauf des Versuchszeitraumes den Versuchstieren verschiedene Organe und Blut entnommen, um in diesen Proben eine mögliche Dissemination der RASF zu untersuchen.

II FRAGESTELLUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Weg der Fibroblastenmigration und einer gezielten Invasion des humanen Knorpels zu untersuchen. Um die Frage nach einer Wanderung der humanen RASF zu beantworten, wurde späteren Mausserien, wie unter 1.2.8 beschrieben, nach Ablauf der Inkubationszeit mit Knorpelimplantaten und RASF neben den Knorpelimplantaten eine Reihe von Organen und Blut entnommen, um die Präsenz von RASF nachzuweisen. Dieser Zellausschluss sollte mittels Immunhisto- und Zytochemie und unter Verwendung von speziesspezifischen Antikörpern gegen Maus bzw. Mensch erfolgen. Um eine ausreichende und repräsentative Anzahl von Versuchstieren zu gewährleisten, wurden von den zur Verfügung stehenden Mausserien bei pro Gruppe mindestens einem zufällig ausgewählten Tier standardmäßig ausgewählte solide Organe einer immunhistochemischen Überprüfung auf RASF unterzogen. Weiterhin sollten in murinem Blut RASF nachgewiesen werden. Für die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Injektionsarten der RASF und der zeitversetzten Implantate wurde für jede Art der Zellgabe ein entsprechendes Tier untersucht. Für die Realisierung der angesprochenen Ziele waren folgende Aufgaben zu bewältigen:

1. Anpassung eines geeigneten Standardprotokolls zur immunhistochemischen Färbung der soliden SCID-Maus-Organen sowie immunzytochemischen Färbung des entnommenen Blutes an die vorliegende Aufgabenstellung
2. Anpassung und Überprüfung der Spezifität der Antikörper
3. Vergleichende immunhistochemische Färbung sämtlicher den Versuchstieren entnommener Organe
4. Anpassung und Optimierung der Immunzytochemie aus dem Blut der Versuchstiere
5. Dokumentation, Auswertung und Interpretation der detektierten Zellfunde

Die aus diesem Tiermodell gewonnenen Daten sollten Erkenntnisse über den Migrationsweg der RASF in Abwesenheit effektorischer Immunzellen liefern. Das Ziel bestand in einem besseren Verständnis der Ausbreitung der RA aus befallenen Regionen heraus in noch nicht betroffene Areale gesunden Gewebes.

III MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Chemikalien und Materialien

Stoffbezeichnung	Bezugsquelle
Aquatex®	Merck, Darmstadt
Kryoröhrchen, 2ml	Greiner Bio, Limburg
Cytospinfilter	Thermo, Dreieich
Dispase	Roche Diagnostics, Penzberg
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 1,0 g/l Glukose ohne L-Glutamin</i>	PAN Biotech, Aidenbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PAN Biotech, Aidenbach
Dulbecco's PBS (<i>phosphate buffered saline</i> , pH 7,2)	PAA Laboratories, Cölbe
Entellan	VWR, Darmstadt
Eosin	Roth, Karlsruhe
Erythrozytenlysepuffer	Quiagen, Hilden
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Flüssiger Stickstoff	MMS, Frankfurt
Fetal calve serum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Gelatineschwamm	Pharmacia, Belgien
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Air Liquide, Böhlen
Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
Heparin	Ratiopharm, Ulm

Stoffbezeichnung	Bezugsquelle
HEPES Puffer	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magermilchpulver	Omira, Ravensburg
OCT Tissue-Tek	Sakura Finetek Germany, Heppenheim
Penicillin/Streptomycin für die Zellkultur	PAA Laboratories, Cölbe
Reaktionsgefäße	Greiner Bio, Limburg
Super Frost Plus Objektträger®	PAA Laboratories, Cölbe
Trypsin	PAA Laboratories, Cölbe
Xylazin	Bayer, Leverkusen
Xylol	Roth. Karlsruhe
Zellkulturflaschen /Zellkulturplatten	Corning Life Sciences, Niederlande

Weitere Chemikalien und Materialien wurden von der Firma Roth, Karlsruhe, oder Sigma-Aldrich, Deisenhofen bezogen.

1.2 Zellen und Gewebe

Die verwendeten SF entstammten Patienten mit gesicherter Diagnose einer RA aus den Abteilungen für Orthopädie der Universitätskliniken Gießen und Regensburg. Im Rahmen eines Routineeingriffes wurden die Synovialgewebe aus dem Kniegelenk entnommen und gekühlt weitertransportiert.

Der für die Implantation bestimmte humane Knorpel wurde Patienten mit Osteoarthritis entnommen, welche sich in der Abteilung für Orthopädie des Justus-Liebig-Universitäts-Klinikums einer Operation zum Einbau einer Knie-Totalendoprothese (Knie-TEP) unterzogen. Das Knorpelmaterial wurde uns mit schriftlicher Einwilligung der Patienten freundlicherweise überlassen und unter sterilen Bedingungen noch am selben Tage zur Implantation im Tiermodell verwendet.

1.3 Antikörper

Über den Verlauf des Experimentes wurden 7 verschiedene Antikörper eingesetzt. Diese sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Primärantikörper

Spezifität	Antikörper		Verdünnung	Bezugsquelle
Follistatin	Maus anti Human	monoklonal	1:100	R&D Systems Wiesbaden Nordenstedt
Vimentin	Maus anti Human	monoklonal	1:100	Dako Deutschland, Hamburg
H2-D ^d	Maus anti Maus	monoklonal	1:50	BD Bioscience, Heidelberg
IL-1R1	Ziege anti Maus	polyklonal	1:25	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
MMP-1	Ziege anti Maus		1:10	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Kollagen Typ IV	Maus anti Human		1:50	Dako Deutschland, Hamburg

1.4 Für die Entwicklung der immunhistochemischen Präparate verwendete Reagenzien

Peroxidase-Substrate-Kit AEC

Axxora Deutschland,
Lörrach

1.5 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Gerät/Software	Herkunft
Mikroskopsystem Leica DM RBE, Bildaufnahmegerät: Leica DC 200 Software: IM 1000	Leica, Wetzlar
Mikrotom: CM 3050	Leica, Wetzlar
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5417C	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Shandon Cytospin 2	Shandon, England
CO ₂ Brutschrank	Heraeus, Hanau
Sterilbank	Thermo, Dreieich

2. Methoden

Die in den Abschnitten 2.1 – 2.2 aufgeführten Methoden beschreiben etablierte Vorleistungen, die dieser Arbeit vorausgingen. Der Verfasser dieser Arbeit wirkte in der Mehrzahl der Versuchsserien mit, bei denen Organe für die beschriebenen Versuche entnommen wurden. Die Mitwirkung bezog sich auf Organentnahmen, Gewebeasservierungen und Mitarbeit bei einigen Operationen. Auch bei den Zytospins wurde in Einzelfällen mitgewirkt.

Die unter 2.3 aufgeführten histologischen Techniken wurden vom Verfasser an die entsprechenden Gewebe angepasst und optimiert. Danach erfolgte die immunhistologische Auswertung aller asservierten Organe.

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Ursprung der Versuchszellen

Die für die Experimente verwendeten RASF entstammten Synovialgewebe, das Patienten entnommen wurde, die sich orthopädischen Routineoperationen (Gelenkersatz, Synovektomie) unterzogen. Sämtliche Patienten erfüllten die 1987 von der ACR aufgestellten Kriterien für die Klassifikation der RA (Arnett FC et. al., 1988). Das Synovialgewebe wurde nach schriftlicher Einwilligung der Patienten von der Abteilung Orthopädie der Universitätsklinik Regensburg in Bad Abbach sowie der Abteilung für Orthopädie der Justus-Liebig-Universität Gießen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Ein entsprechendes Ethikvotum liegt vor.

2.1.2 Isolierung der Fibroblasten aus Synovialgewebe

Zur Isolierung der RASF aus dem Synovialgewebe wurden die Gewebestücke manuell mit dem Skalpell in ca. 0,5 mm³ große Stücke zerteilt. Darauf folgte die enzymatische Behandlung in steriler Dispaselösung für eine Stunde bei 37°C. Die Zellen wurden durch einen *Cellstrainer* vom übrigen Rest getrennt. Diesem Vorgang schloss sich die Zentrifugation der Zellen bei 300 x g für 10 min und eine Waschung mit

DMEM an. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in 75 cm³ Zellkulturflaschen (ZKF) transferiert und bei 37°C/10% CO₂ relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Um nicht adhären Zellen und Gewebereste zu entfernen, wurde das Medium nach 24 h erstmalig gewechselt. Anschließend wurde das Medium alle 2-3 Tage gewechselt.

Unter Standardbedingungen wurden die Zellen darauf bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert, passagiert und in 75 cm² ZKF ausgesät und weiter kultiviert (Neumann E et al., 2002). Mittels PCR erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der Kulturen auf Mykoplasmen.

2.1.3 Zellkultur

Das für die Zellkultur standardmäßig verwendete Medium setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 4: Zusammensetzung des Zellkulturmediums

DMEM + 10 % FCS			500 ml
Grundmedium: DMEM (1 g/l Glucose)			
FCS	50 ml	10 % (v/v)	
HEPES	5 ml	1 % (v/v)	
Penicillin/Streptomycin	5 ml	1 % (v/v)	

2.1.4 Passagieren der Zellen

Bei 90 % Konfluenz wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA von den ZKF abgelöst. Hierzu wurde vor Arbeitsbeginn das zu verwendende Trypsin/EDTA und Zellmedium auf 37°C im Wasserbad aufgewärmt. Danach wurden die Mediumüberstände in der ZKF abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Trypsin wurde in die ZKF gegeben. Die ZKF wurden anschließend bei 37°C für 4 Minuten in den Brutschrank gestellt. Darauf wurden unter leichtem Abklopfen die Zellen von der ZKF gelöst, 5 ml Medium hinzugefügt und in ein 15ml-Reaktionsröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden zwei frische ZKF vor-

bereitet, in welche je 10 ml Kulturmedium vorgelegt wurde. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 4 ml Medium resuspendiert. In jede Kulturflasche wurden 2 ml Zellsuspension gegeben, die Flaschen leicht geschwenkt und bei 37°C in den Inkubator gegeben.

2.1.5 Einfrieren der Zellen

Zur Lagerung über längere Zeit wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff deponiert. Vor dem Einfrieren wurde das Einfriermedium, bestehend aus 50 ml FCS + 10% DMSO, vorbereitet. Anschließend wurde das Nährmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 5 ml PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen erfolgte wie unter 2.1.5 beschrieben. Das Pellet wurde dann in 4 ml Einfriermedium resuspendiert. Hiervon wurden jeweils 2 ml in ein Kryoröhrchen gegeben und die Röhrchen für einen Tag bis zur Überführung in den Stickstofftank in eine Freezerbox bei -80°C gestellt.

2.1.6 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Zellen zunächst auf Trockeneis zwischengelagert. In einem auf 37°C temperiertem Wasserbad wurden die Kryoröhrchen vorsichtig aufgetaut. Darauf wurden die Zellsuspensionen in jeweils ein 15ml-Reaktionsröhrchen mit 10 ml Nährmedium gegeben. Die Zellen wurden für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml Medium resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 75 cm² ZKF, in die 10 ml Medium vorgelegt worden war, gegeben. Die ZKF wurden in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

2.1.7 Bestimmen der Zellzahl

Die Zellzahl in den ZKF wurde in Neubauer-Zählkammern bestimmt. Die in den vier diagonal gegenüberliegenden und 16-fach unterteilten Quadranten befindlichen Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung wurde die Gesamtzellzahl pro ml aus der erhaltenen Zellzahl multipliziert mit 2500 errechnet.

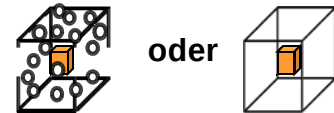
2.2. Das SCID-Maus-Modell der RA

2.2.1 Ursprung der Versuchstiere

Bei der SCID-Maus handelt es sich um einen Mausstamm, der sich durch das vollständige Fehlen von B- und T-Zellen auszeichnet (siehe Abschnitt 1.2.5). Durch diesen Mangel eignet sich das Tier hervorragend als Versuchstier für Xenoimplantationen, da das Immunsystem der Maus nicht in der Lage ist, diese abzustoßen. Im Rahmen des Experimentes wurden SCID-Mäuse vom Stamm Crl-scidBr2 verwendet. Die Tiere wurden von einer keimfreien Zucht (Charles River, Sulzfeld) bezogen und intraoperativ auf makroskopisch sichtbare Anomalien untersucht. Sämtliche Tiere waren weiblichen Geschlechts und bei Erhalt 4-6 Wochen alt.

2.2.2 Implantierung unter die Haut

Der humane Knorpel wurde mittels der *inverse-wrap*-Methode (siehe Abschnitt 1.2.7) den SCID-Mäusen subkutan eingesetzt. Hierzu wurde zunächst das Knorpelmateriale unter sterilen Bedingungen mit dem Skalpell in mehrere ca. 3-5mm³ große glattkantige Stücke zerteilt. Ein ca. 80mm³ großer inerter Gelatineschwamm wurde vorbereitet und in diesen ein Knorpelstück eingesetzt. Die als primäre Implantate vorgesehenen KI wurden nun in einer sterilen Kochsalzlösung mit resuspendierten Fibroblasten (ca. $1-5 \times 10^5$ Zellen) getränkt. Die als lateral vorgesehenen KI wurden dagegen nur mit steriler NaCl-Lösung versetzt. „Primär“ bezeichnet hier die rechte Flanke der Maus, „lateral“ die linke. Anschließend erfolgte die operative Implantation der KI unter sterilen Bedingungen (Judex M et al., 2001). Dies geschah mittels chirurgischer Eröffnung der Haut der narkotisierten Tiere seitlich über dem rechten bzw. linken Hinterlauf der Maus und der Bildung einer geeignet großen Hauttasche über den Muskelfaszien mittels stumpfer Präparation. In diese Subkutantaschen wurden die präparierten KI eingesetzt. Die Haut wurde anschließend mit einem chirurgischen Faden engmaschig vernäht. Zum Schluss wurde die Maus bis zum Aufwachen auf einer Wärmeplatte warm gehalten und nach Erwachen zurück in den Käfig gesetzt.



Quelle: E. Neumann

Abbildung 6: Implantierung in die SCID-Maus mittels der „*inverse-wrap*“-Methode. In das Versuchstier werden die Knorpel-Schwamm-Koimplantate seitlich auf Höhe der Flanken eingesetzt. Das primäre KI wurde zuvor in eine Suspension aus Nährmedium und RASF getaucht, das gegenüber implantierte KI wurde ohne Zellen eingesetzt.

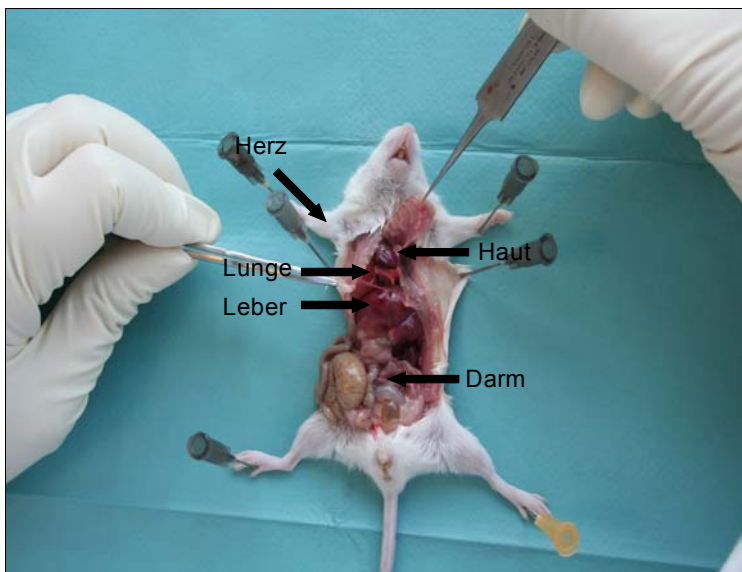
2.2.3 Injektion der RASF in die Versuchstiere

In einem alternativen Versuchsansatz wurden den Versuchstieren die kultivierten RASF erst nach Abheilung der Operationswunden nach 14 Tagen injiziert. Die RASF wurden intravenös über die Schwanzvene, intraperitoneal oder subkutan injiziert. Für die subkutane Applikation wurde als Injektionsstelle das mediane Rückenareal etwa 2 cm hinter dem Kopf gewählt. Die Haut wurde manuell leicht nach oben gezogen und die Spritze von kaudal kommend in die Subkutanregion vorgeschoben. Die vierte Untergruppe erhielt Zellen und Knorpel entsprechend dem ursprünglichen Protokoll unter die Flanke am Tag der Implantation.

2.2.4 Entnahme der Implantate sowie der Mausorgane

Nach 60 Tagen erfolgte die Entnahme und Analyse der Implantate, des Mausblutes sowie der Organe. Die Tiere wurden tierschutzgerecht getötet. Um Degradations- und Abbauprozesse in den Implantaten wie auch Nekroseschäden an den Organen zu vermeiden, wurde unmittelbar nach Ausbleiben der Vitalzeichen der Mäuse mit der Entnahme begonnen. Auf die Entnahme der beiden Implantate folgte die Entnahme einer ausreichenden (ca. 1 ml) Menge Mausblutes (Heparinblut) aus den Nieren-

gefäßsen. Anschließend wurden die inneren Organe entnommen, Leber, Milz, Niere, Lunge, Herz, Dünndarm und ein axialer Lymphknoten. Weiterhin wurden ein Ohr, je ein kleines Areal Haut in unmittelbarer Nähe des Implantats und aus dem Gebiet in der Nähe des Halses sowie eine Zehe mit intaktem Gelenk entnommen. Die Organe und Implantate wurden umgehend in Gefriermedium (OCT™ Tissue Tek®) eingebettet und in flüssigem Stickstoff langsam eingefroren. Die Lagerung der Gewebe erfolgte bei -80°C. Das Mausblut wurde zunächst bei 4°C gelagert und dann abgesert.



Quelle: E. Neumann

Abbildung 7: SCID-Maus im OP-Präparat:

Der Maus werden im Anschluss an die Blutentnahme die Organe zur weiteren Untersuchung entnommen (siehe Pfeile).

2.2.5 Dokumentation und Scoring der Implantate

Die erstellten histologischen Färbungen der Implantate wurden, ebenso wie die Organe und der aus dem Blut der Tiere gewonnenen Schnitte, ebenfalls mittels eines Leica-Mikroskopsystems, unterstützt durch die Bildaufnahmesoftware IM 1000, fotografiert und im jpeg-Format gespeichert. Aus den Implantaten wurden histologische Schnitte angefertigt und eine HE-Färbung durchgeführt. Jeder Schnitt wurde hinsichtlich des sichtbaren Grades der Fibroblasteninvasion in den Knorpel und der perichondrozytären Knorpeldegradation evaluiert (Judex M et al., 2001). Jedes Scoring wurde von mindestens 4 erfahrenen Untersuchern durchgeführt. Die jeweiligen Einzelwerte für ein Implantat wurden addiert, der errechnete Mittelwert jeweils verwendet und die statistische Standardabweichung ermittelt.

2.2.6 Übersicht über die Versuchsserien

Im Rahmen der Studie zur Migration der RASF wurde das SCID-Maus-Modell zur Erforschung der RA in verschiedenen Serien eingesetzt. Von den in Tabelle 5 dargestellten Mausserien wurden die entnommenen Organe für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verwendet.

Insgesamt wurden 20 Tiere (aus den jeweils verschiedenen Gruppen je ein Tier, vgl. Tabelle 5) untersucht. Pro Tier wurden jeweils 11 Organe untersucht. Daraus ergab sich die Gesamtsumme von 220 auf RASF überprüfte Organe. Variiert wurden die Antikörper-Konzentrationen, Fixierung, Blocking, Inkubationsdauer und Primär-Antikörper. Die für die Versuchsanfordernisse am besten geeignete Kombination wurde als immunhistologisches Protokoll für Organe und Zytospins etabliert und mit dieser die Histologien durchgeführt. Zusätzlich wurden bei jedem Tier Zytospins zur Analyse der möglicherweise im Blut vorkommenden humanen Fibroblasten durchgeführt.

2.3 Histologische Methoden

2.3.1 Anfertigung von Gewebsschnitten

Die in Gefriermedium (OCT™ Tissue-Tek) eingebetteten Organpräparate wurden mit Hilfe eines Gefriermikrotoms geschnitten. Hierbei wurden bei einer Temperatur zwischen -20 und -15°C jeweils 5 µm dicke Gewebsschnitte der Organe hergestellt und auf spezielle Objektträger (Super-Frost Plus®) aufgebracht. Nach kurzem (2-3 Minuten) Antrocknen bei Raumtemperatur (RT) erfolgte die Fixierung des Schnittes in Azeton für 10 Minuten. Nach Abdampfen des Azetons für mindestens 60 Minuten konnte nun entweder die sofortige Verwendung der Präparate zur immunhistologischen Färbung, Qualitätsbegutachtung mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H-E-Färbung) oder einstweilige Lagerung bei -20°C vorgenommen werden.

Tabelle 5: Mausserien

Seriennummer	Tierzahl	Versuchsmodell	OP	Zur Organuntersuchung verwendete Tierzahl
1	10	„klassisch“	2 Implantate primär 1 Implantat lateral	n = 1
2	5	„zeitversetzt“	Tag 0: Implantation nur Knorpel lateral Tag 14: Knorpel+RASf primär Tag 60: (49 Tage in Maus) Entnahme der Proben	n = 1
3	5	„zeitversetzt“	Tag 0: Knorpel+RASf primär Tag 11: Knorpel lateral Tag 30: Blutentnahme Tag 60: (49): Entnahme der Proben	n = 1
4	10	„Injektion“	Tag 0: Knorpel beidseits ohne Zellen (8Tiere) Tag 20: Injektion von RASf: 2x ip 3x iv 3x sc 2x Kontrolle (Zellen und Knorpel primär, lateral nur Knorpel) Tag 66: Entnahme der Proben (46)	n = 4 je 1 ip je 1 iv je 1 sc (1 Kontrolle)
5 6 8 9	5: 10 6: 9 8: 10 9: 19 = 48	„Injektion“	Tag 0: Knorpel beidseits ohne Zellen Tag 14: Injektion von RASf 3x ip 3x iv 4x sc Tag 60: (49) Probenentnahme	n = 12 je 1 ip je 1 iv je 1 sc (3 pro Serie)
7	5	„bovin“: „klassisch“	4 Tiere: Knorpel beidseits, primär RASf, lateral ohne Zellen 1 Tier: Kontrolle, nur Knorpel primär; ohne Zellen Tag 60: (49) Probenentnahme	n = 1
Summe untersuchter Tiere				N = 20

2.3.2 H/E - Färbung

Die histologischen Organschnitte wurden, nach eventuell erforderlicher Lufttrocknung und anschließender Rehydrierung, für 10 Minuten in Hämatoxylin (Hämatoxylin (C.I.75290), Ammoniumalaun, Ethanol 96%ig, Natriumjodat, Methanol, Glycerin, abs. Isopropanol gegeben. Nach anschließendem kurzen Abwaschen des Farbstoffes in destilliertem Wasser folgte eine 10-minütige Inkubation in Eosinlösung (Anilinblau w.s. (C.I.42755), Eosin G (C.I.45380), konz. Salzsäure, denat. Ethanol 96%ig, Isopropanol 100%ig). Nach Abwaschen des Farbstoffes in destilliertem Wasser erfolgte

eine jeweils mindestens 5-minütige Inkubation in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (50% → 70% → 96% → 100%). Nach dreimaliger Inkubation in einem Xylol-Bad (pro Bad 5 Minuten) wurden die Schnitte in Entellan® Eindeckmedium eingedeckt.

2.3.3 Immunhistochemie (Entwicklung mittels AEC Substrat-Kit)

Diese Technik diente der Detektion von humanen/murinen Zellen mittels Antikörpern, die gegen spezifische Antigene gerichtet sind. Hierbei war besonders auf die Spezifität zu achten, um mittels der verwendeten Antikörper zwischen humanen und murinen Zellen differenzieren zu können. Zur Detektion der RASF wurden Antikörper gegen humanes Vimentin und Follistatin verwendet. Beide Proteine werden durch RASF exprimiert. Weitere Antikörper gegen IL1-R1 und MMP-1 wurden nach ausführlicher Testung auf zu detektierende RASF als nicht geeignet befunden und aus dem Standardprotokoll entfernt. Als Positivkontrolle wurde mit dem ubiquitär exprimierten murinen anti-MHC-Komplex H2-D^d gegengefärbt. H2-D^d liegt als Substruktur des MHC-I-Proteins auf allen kernhaltigen Zellen der SCID-Mäuse vor, wenn auch in unterschiedlicher Menge. Nach der Anpassung an die hier vorliegenden Organe wurde für sämtliche Organschnitte dasselbe Standardprotokoll verwendet, welches sich zur Detektion der RASF der Zweischnitt-Methode mittels N-Histofine® bediente. Dieses sah zunächst das 3- bis 8-minütige Auftauen der bei -20° C eingefrorenen Gewebsschnitte bei RT vor. Anschließend erfolgte die Rehydrierung der Gewebe durch 5-minütige Inkubation in PBS. Zum Blocken unspezifischer Bindungen wurde eine Lösung bestehend aus 2 % Magermilchpulver in PBS verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei RT wurde die Magermilchlösung entfernt. Es folgte die Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern. Die Verdünnungen sind Tab. 3 zu entnehmen. Nach 60-minütiger Inkubationszeit bei RT wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation in 0,3 % Wasserstoffperoxid in Methanol für 30 Minuten bei 4°C zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität. Nach erneutem dreimaligen Waschen in PBS kam als sekundärer Antikörper das mit Meerrettichperoxidase (*HorseRadishPeroxidase*, HRP) – konjugierte N-Histofine®-System entsprechend der Spezies, in der der Primärantikörper generiert wurde, zur Signalsichtbarmachung zum Einsatz. Die Antikörperlösung wurde für 30 Minuten bei RT auf den Schnitten belassen und einschließlich nicht gebundener Antikörper durch

dreimaliges Waschen in PBS entfernt. Die Chromogengabe (AEC) erfolgte für die Enzymreaktionen mit der Meerrettichperoxidase zur Sichtbarmachung der gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe. Die Farbreaktion konnte mikroskopisch nach 3-15 Minuten detektiert werden. Die Enzym-Substrat-Reaktion wurde durch Waschen in PBS abgestoppt. Nach kurzer Antrocknung der Schnitte an der Raumluft erfolgte die Eindeckelung mittels Aquatex®. Für jede einzelne Immunhistochemie wurden zusätzlich mehrere Kontrollen mitgeführt. Ein Schnitt diente als Negativkontrolle und wurde nur mit Blockingserum ohne Primärantikörper behandelt. Ein weiterer Schnitt wurde als Reagenzkontrolle für das Histofine-System nur mit Blockingserum, Wasserstoffperoxid und Histofine behandelt. Bei der Isotypkontrolle wurde anstelle eines Primärantikörpers der Isotyp (z.B. anti-Maus-IgG) verwendet. Sämtliche Kontrollen wurden zusammen mit den anderen Schnitten mittels des AEC-Kits gefärbt.

2.3.4 Immunzytochemie

Zur Gewinnung von Blutzellen für die Immunzytochemie wurde den SCID-Mäusen während der Tötung der Mäuse mittels einer 2 ml Spritze ca. 1 ml Blut entnommen. Durch Zentrifugation bei 12000 g für 10 Minuten wurde das Blut in seine korpuskulären und nicht-korpuskulären Bestandteile aufgetrennt. Während das gewonnene Serum bei -20°C eingefroren wurde, wurde das Pellet für die Immunzytochemie verwendet. Hierzu erfolgte eine zweifache Erythrozytenlyse mittels eines zitrathaltigen Lysepuffers (Erythrozytenlysepuffer, Qiagen) und anschließender Zentrifugation der zerstörten roten Blutkörperchen, womit eine allmähliche Reduktion der Zelldichte, lichtmikroskopisch verfolgt, erreicht wurde. Für die folgende Immunzytochemie wurden die Zellen mit Hilfe einer speziell für Zytospins konstruierten Zentrifuge und eines dazugehörigen Trichter-Filter-Systems auf Objektträger aufgebracht. Diese Technik sorgte für eine Anhaftung der Zellen auf den Objektträgern, um eine Ablösung während der Immunzytochemie zu vermeiden. Da die Zellen durch die Zentrifugation auf die Objektträger „gepresst“ wurden, waren die Zellen nach dem Zytospin flach auf den Objektträger gedrückt und, z.B. im Fall der Fibroblasten, nicht mehr spindelförmig. Nach Fixierung des Zellaustriches durch 10 Minuten Inkubation in Azeton bei 4°C erfolgte die immunzytochemische Färbung. Die folgenden Arbeitsschritte, wie auch die verwendeten Kontrollen, waren mit denen der Immunhistochemie identisch.

2.4 Dokumentation und Scoring der Mausorgane

Die erstellten histologischen Färbungen der Organe sowie des Blutes der Tiere wurden mittels eines Leica-Mikroskopsystems und der Bildaufnahmesoftware IM 1000 dokumentiert und gespeichert.

Die Abbildungen der Organfärbungen und Färbungen der Zytospins wurden lichtmikroskopisch und am Computer nach Zellfunden und Zellhäufigkeit ausgewertet. Bei den Zytospins galt eine in der mikroskopischen Abbildung sichtbare Färbung einer Zelle mit den Antikörpern gegen humanes Follistatin oder humanes Vimentin, bei gleichzeitiger Nichtfärbung der Zellen in den Iso- und Negativkontrollen, als positiver Zellfund. Bei den Färbungen der soliden Organe wurde ein Zellfund nur bestätigt, wenn eine Färbung des betreffenden Anschnittes des Organs sowohl mit der Vimentin- als auch mit der Follistatin-Färbung an gleicher Stelle spezifisch deutlich sichtbar, sowie die dazugehörigen Reagenz-, Isotyp- und Negativkontrollen eindeutig negativ waren. Sowohl für die Zytospins als auch für die soliden Organe diente der gegen Mausantigene gerichtete Anti-H2-D^d-Antikörper als Positivkontrolle. Zum Scoring der immunhistologischen Organfärbungen wurde folgendes Schema angewendet (siehe Tabelle 6):

Tabelle 6: Scoring der Zellfunde in den soliden Organen

Scoring der Zellfunde in den soliden Organen	
keine Zellen	0 Zellfunde
vereinzelte Zellen	1-10 Zellfunde
wenige Zellen	10-50 Zellfunde
viele Zellen	50-100 Zellfunde

IV ERGEBNISSE

1. Immunhistochemische Untersuchung der Organe

Die einzelnen Serien lassen sich in 3 verschiedene Versuchsmodelle untergliedern (vgl. Tabelle 5, Seite 32). Die Serien 1 und 7 gehörten dem sog. „klassischen Maus-Modell“ an, bei dem RASF-enthaltende und RASF-freie KI gleichzeitig implantiert wurden. Bei den Serien 2 und 3 wurden zunächst RASF enthaltende KI implantiert, 14 Tage später RASF-freie KI. Diese wurden nach dem Modell der „zeitversetzten“ Zellgabe behandelt um Wundheilungseffekte als Attraktionsfaktoren für die RASF auszuschließen. In den Serien 4, 5, 8 und 9 wurden die RASF per Injektion nach 14 Tagen appliziert. In den Serien, bei denen sämtliche SCID-Mäuse die gleiche Behandlung erfuhren, wurde ein willkürlich ausgewähltes, repräsentatives Tier untersucht. Dies war der Fall bei den Serien 1, 2, 3 und 7. Bei den Serien 5, 6, 8 und 9 wurden, den drei Applikationsformen der RASF entsprechend, jeweils 3 Tiere auf Zellmigration hin geprüft. In Serie 4 wurden zuzüglich zu den i.p.- s.c.- und i.v.-Injektionen auch zwei Tiere nach dem „klassischen Implantationsmodell“ operiert, von denen eines untersucht wurde. Die Reihe der entnommenen Organe umfasste bei jedem Versuchstier die Organe Darm, Haut nahe dem Implantat, Haut in Entfernung des Implantats, Herz, Leber, Lunge, einen axialen Lymphknoten, Niere, Milz, ein Ohr inklusive Ohrknorpel und ein Zehgelenk. Insgesamt wurden für diese Arbeit 220 Organe entnommen (siehe Tabelle 7). Von jedem dieser Organe wurden mittels Mikrotom serielle Kryoschnitte hergestellt und immunhistochemisch gefärbt. Damit war eine ausreichend große Fallzahl gewährleistet, um eine Aussage über die Fibroblastenmigration und deren Dissemination in den verschiedenen Organen treffen zu können.

Tabelle 7: Untersuchte Organe

Untersuchte Mäuse	20
Untersuchte Organe pro Tier	11
Untersuchte Organe insgesamt	220

Wie in Abschnitt 2.5 bereits dargelegt, wurde bei der Auswertung der Organe nur eine Färbung spezifischer Strukturen mittels verschiedener Antikörper, speziesspezifischer Gegenfärbung und entsprechend negativer Kontrollen als Zellfund gewertet. Da es sich bei den angefertigten Gewebsschnitten um Serienschritte handelte, war es weiterhin erforderlich, dass bei beiden humanen Antikörperfärbungen an ähnlicher Lokalisation im Gewebe die positiven Signale zu finden waren. Des Weiteren durfte bei den parallel durchgeführten Isotyp- und Reagenz-Kontrollen keine Färbung vorliegen. Als Positivkontrolle für das Gelingen der Immunhistochemie wurde ein gegen H2-D^d gerichteter Antikörper, der das murine Gewebe anfärbt, verwendet.

1.1 Dünndarm

Zur Untersuchung von RASF im Gastrointestinaltrakt wurde den Versuchstieren ein Teil des Dünndarmes entnommen. Hierbei war insbesondere auch die Frage von Bedeutung, ob die intraperitoneale Applikation der Zellen mit einem erhöhten Aufkommen von RASF im Gastrointestinaltrakt einherging (Abb. 7). Bei sämtlichen angefertigten Dünndarmschnitten, die zeitversetzten Applikationen eingeschlossen, konnte kein Nachweis einer fibroblastären Dissemination erbracht werden (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Zellfunde Dünndarm

Untersuchte Organe	20
Keine Zellen nachweisbar	20
Vereinzelte Zellen nachweisbar	0
Wenige Zellen nachweisbar	0
Viele Zellen nachweisbar	0

Bei der in Abbildung 7 (D) dargestellten Anti-Vimentin-Färbung bleibt eine spezifische Färbung aus. Ebenso negativ bleiben die hier aufgeführten Negativ- und Reagenz-Kontrollen, die hier einmalig mit dargestellt werden. Zum besseren Vergleich einer deutlich positiven Färbung mit einer negativen Färbung färben sich in der Positivkontrolle die für den Gastrointestinaltrakt typischen Zellstrukturen deutlich an. Die Einbeziehung einer Positivkontrolle ist für den Nachweis einer erfolgreichen Immunhistochemie unerlässlich.

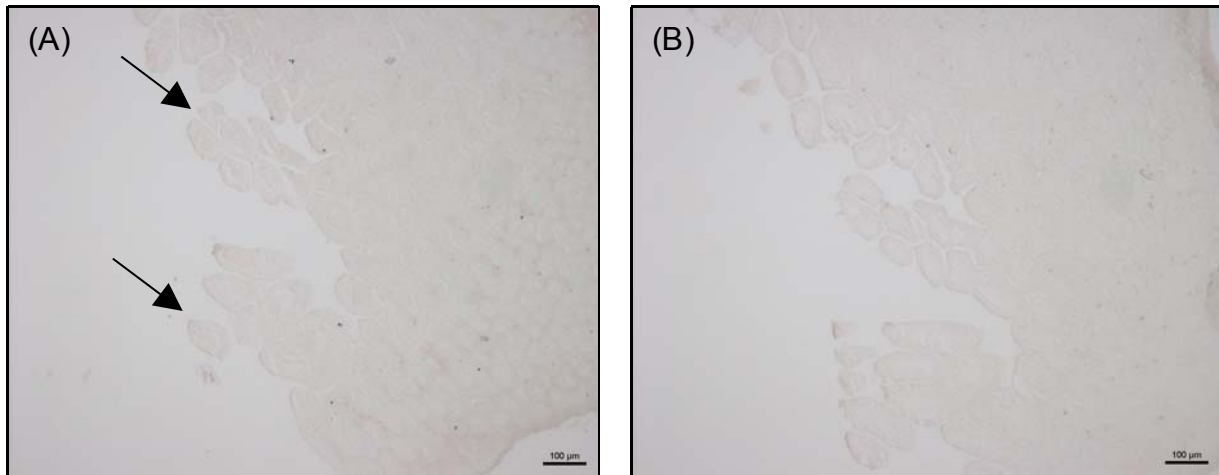
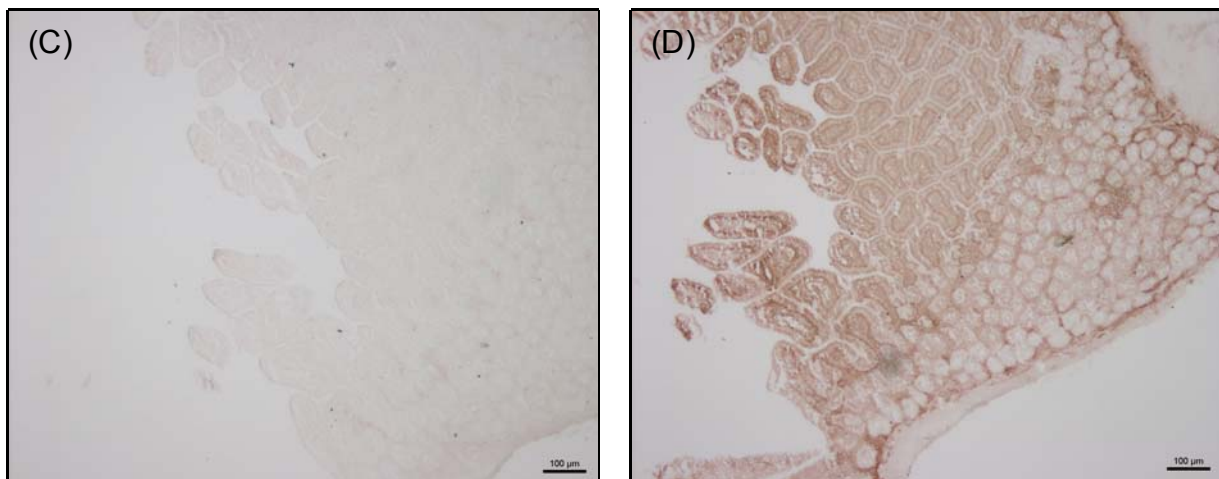


Abbildung 8: (A) Repräsentativer Schnitt des Darmes eines Versuchstieres in der Negativ-Kontrolle. Gut zu erkennen sind die Darmzotten (Pfeile). Durch das Fehlen eines primären Antikörpers bleibt eine Färbung aus. Die Kontrolle bleibt negativ.

(B) Dasselbe Organ im seriellen Schnitt, dargestellt ist hier die Reagenzkontrolle. Hierfür wurde kein primärer Antikörper, jedoch als sekundärer Antikörper Histofine-anti-maus® aufgetragen. Durch das Fehlen einer primären Bindungsstelle bleibt der Schnitt ungefärbt, die Reagenzkontrolle bleibt damit negativ.



(C) Darmanschnitt desselben Organs wie in den Abbildungen 6 A und B. Nach der immunhistochemischen Färbung mittels des anti-Vimentin-Antikörpers. Es ist keine spezifische Färbung zu erkennen. Gleiches gilt für die hier nicht mit abgebildete Färbung mittels des Anti-Follistatin-Antikörpers.

(D) Zur Positivkontrolle wurde eine Färbung mit dem anti-H2-D^d-Antikörper durchgeführt, der alle Mauszellen anfärbt. Dadurch sind deutlich die Strukturen des vorliegenden Darmgewebes zu erkennen.

Sämtliche Negativ- und Reagenzkontrollen in den übrigen Organen blieben ebenso ohne Färbung. Daher wurde im Verlauf auf weitere Darstellung von Negativkontrollen verzichtet.

1.2 Herzmuskel

Im Rahmen der Hypothese einer RASF-Migration über die Blutzirkulation wurde auch im Herzmuskel sowie dort befindlichen zu- und abführenden Gefäßen nach Zellen gesucht. Es konnten keine Zellen nachgewiesen werden. Sämtliche Herzmuskel-schnitte blieben bei allen Tieren frei von Zellfunden (siehe Tabelle 9 und Abbildung 8), den verbleibenden Inhalt großer Gefäße auf einigen Anschnitten mit eingeschlossen. Ein Problem bei Gefrierschnitten ist allerdings auch, dass im Verlauf der immun-histochemischen Färbung und dem mit dieser Technik einhergehenden mehrmaligen Waschen die Gefäßinhalte aus den Gefäßen gespült werden. Dies trifft insbesondere auf größere Gefäße, wie z.B. im Herz, zu. So konnten in den gefärbten Gefäßen weder mauseigene noch humane Blutzellen gefunden werden. Die Herzmuskulatur und andere Gewebe enthielten ebenfalls keine humanen RASF (Abb. 8).

Tabelle 9: Zellfunde Herzmuskel

Untersuchte Organe	20
Keine Zellen nachweisbar	20
Vereinzelte Zellen nachweisbar	0
Wenige Zellen nachweisbar	0
Viele Zellen nachweisbar	0

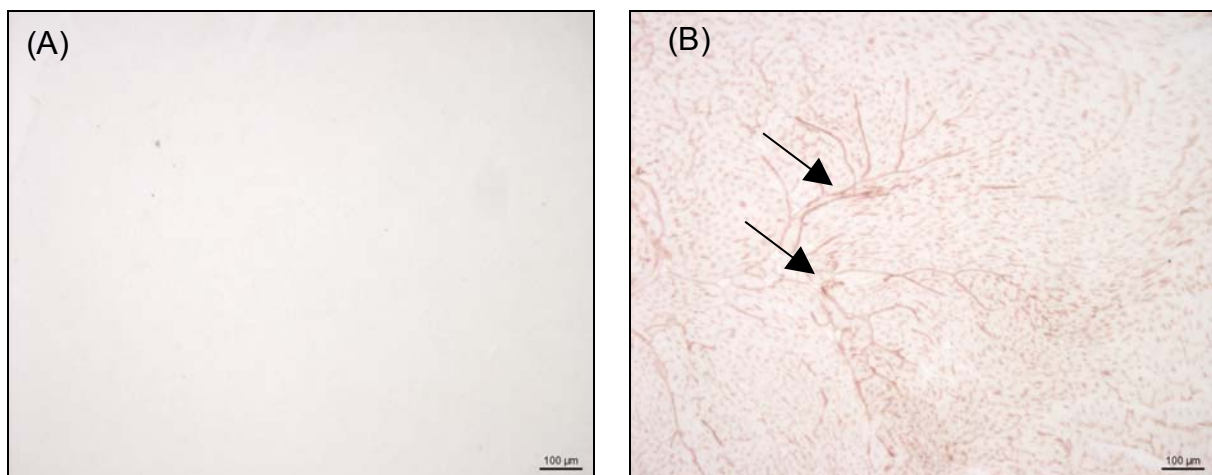


Abbildung 9: (A) Ein Gewebsschnitt vom Herz nach Anti-Vimentin-Färbung: Es ist keine spezifische Färbung sichtbar, die gewebeeigenen Strukturen sind daher praktisch nicht erkennbar.

(B) Zu sehen ist das gleiche Organ wie in (A) nach H2-D^d-Färbung zur Darstellung der murinen Gewebe als Positivkontrolle. Der Herzmuskel ist durch die deutliche Anfärbung der kardialen Myozyten und der bindegewebigen Strukturen des Herzsyziums gut erkennbar (Pfeile).

1.3 Leber

Wie das Herz wird auch die Leber von einem beträchtlichen Blutvolumen, sowohl aus der Zirkulation als auch portal, durchströmt. Aus ähnlichen Motiven wie beim Herz wurde auch dieses Organ einer immunhistochemischen Untersuchung auf RASF unterzogen. Es konnte kein Nachweis für RASF in der Leber erbracht werden. Sämtliche Färbungen an Leberanschnitten blieben bei allen Tieren negativ (siehe Tabelle 10 und Abbildungen 9 A und B). Dies schließt auch den Inhalt von Arterien oder Zentralvenen auf einigen Anschnitten mit ein. Auch hier sind jedoch nach der Immunhistologie die meisten Gefäße ohne Inhalt und daher nicht anfärbbar.

Tabelle 10: Zellfunde Leber

Untersuchte Organe	20
Keine Zellen nachweisbar	20
Vereinzelte Zellen nachweisbar	0
Wenige Zellen nachweisbar	0
Viele Zellen nachweisbar	0

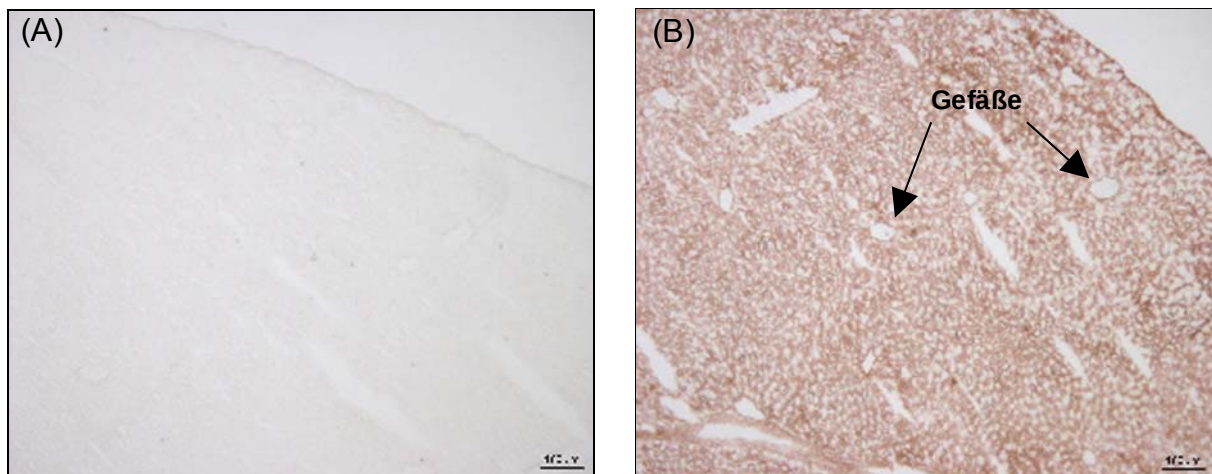


Abbildung 10: (A) Anti-Vimentin-Färbung der Leber: Wie auch im Herzschnitt ist keine spezifische Färbung erkennbar

(B) Gleiches Organ wie in Abb. 9 A nach H2-D-Färbung als Positivkontrolle zur Färbung muriner Gewebe. Zu erkennen ist die deutliche Färbung des Lebergewebes einschließlich zu identifizierender Portalfelder mit Zentralvenen.

1.4 Lunge

In den angefertigten Anschnitten der Lunge fand sich kein Nachweis für RASF. Bei sämtlichen untersuchten bronchialen und alveolären Strukturen konnte kein Nachweis für eine fibroblastäre Dissemination erbracht werden (siehe Tabelle 11 und Abbildungen 10 A und B) Gleiches wurde auch für angeschnittene Gefäße festgestellt, die wie auch die Gefäße der Leber und des Herz keinen Inhalt mehr hatten.

Tabelle 11: Zellfunde Lunge

Untersuchte Organe	20
Keine Zellen nachweisbar	20
Vereinzelte Zellen nachweisbar	0
Wenige Zellen nachweisbar	0
Viele Zellen nachweisbar	0

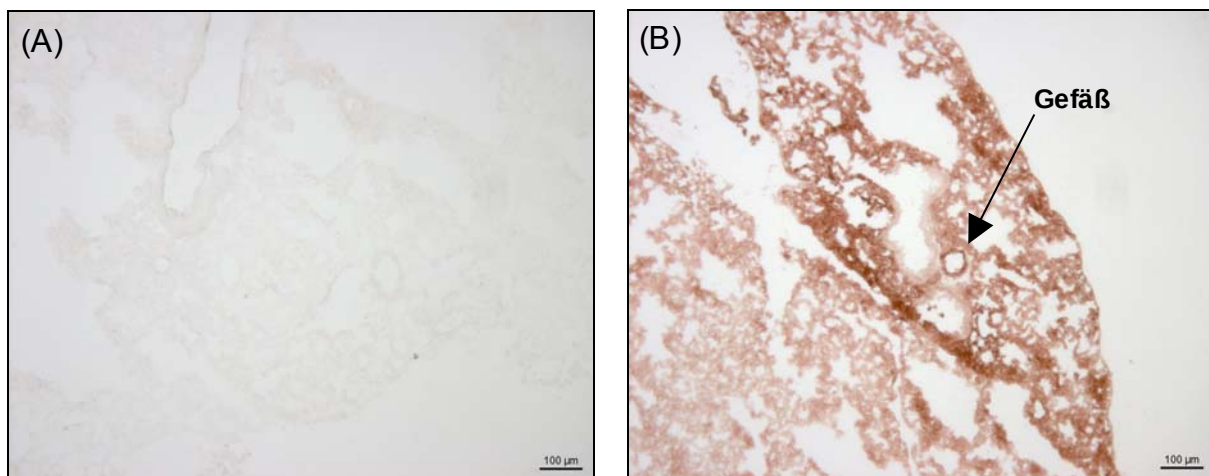


Abbildung 11: (A) Zu sehen ist die Lunge nach Anti-Vimentin-Färbung. Das Gewebe ist durchgehend nicht angefärbt. Daraus ergibt sich kein Nachweis für humane RASF.
(B) Dargestellt ist das gleiche Organ wie nach H2-D^d-Färbung als Positivkontrolle. Das lockere Alveolargewebe der Lunge lässt sich anhand der kräftigen Färbung der murinen Gewebe gut nachvollziehen.

1.5 Niere

Die Niere als Ausscheidungs- und Filterorgan durchströmt ein hoher Anteil des Gesamtblutvolumens. Aus ähnlichen Motiven wie auch bei Leber, Milz und Herz, gehörte die Niere zur Analyse der für die Migrationswege relevanten und damit zu analysierenden Organe. Bei 20 untersuchten Nierenpräparaten gelang einzig der Nachweis einer fibroblastären Dissemination bei einem ip gespritzten Tier der Serie 5. In beiden Antikörperfärbungen für humane Zellen fanden sich wenige aber deutlich positive Signale (siehe Tabelle 12 und Abbildungen 11 A und B).

Tabelle 12: Zellfunde Niere

Untersuchte Organe	20
Keine Zellen nachweisbar	19
Vereinzelte Zellen nachweisbar	0
Wenige Zellen nachweisbar	1
Viele Zellen nachweisbar	0

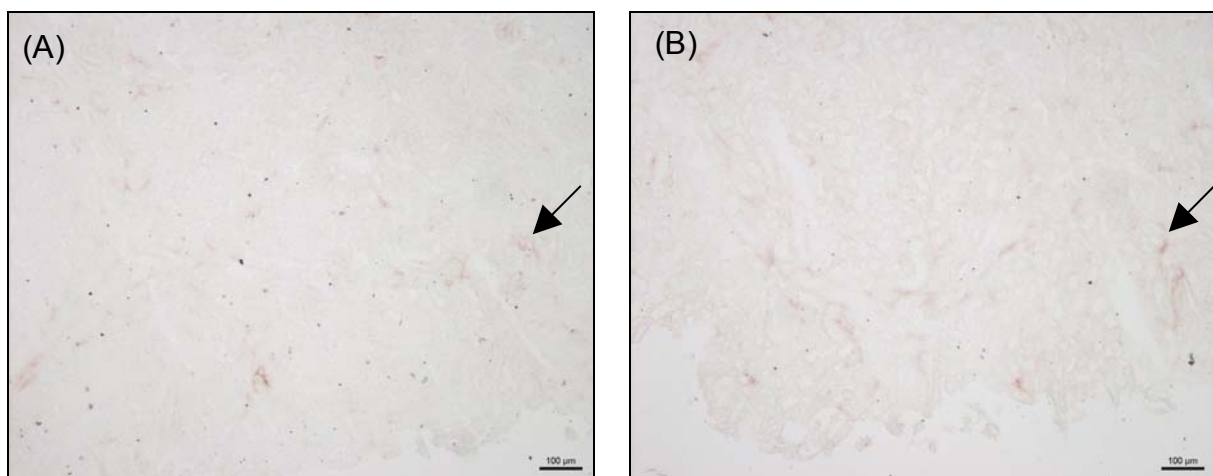


Abbildung 12: (A) Nierenschnitt nach Anti-Vimentin-Färbung: Es fallen mehrere, an die tubulären Strukturen angelagerte, positive RASF-Signale auf (Pfeile).

(B) Dargestellt ist das gleiche Organ wie in Abbildung 11 A nach anti-Follistatin-Färbung: Morphologisch sehr ähnliche positive Färbungen von RASF wie in der Anti-Vimentin-Färbung, gelagert an die Tubuli, sind ersichtlich.

1.6 Lymphknoten

Die Lymphknoten als Filterstationen und als wichtiges Organ der Immunabwehr wurden trotz des Fehlens einer humoralen Abwehr bei den immundefizienten SCID-Mäusen untersucht. Auffällig sind die kleinen, wegen Atrophie schwierig aufzufindenden Lymphknoten in den B- und T-Zell-defizienten Tieren. Bei den entnommenen Lymphknoten handelt es sich, wie in Abschnitt 2.3.6 beschrieben, um axiale Lymphknoten. Unter den 20 untersuchten Präparaten konnten bei einem Tier vereinzelte RASF nachgewiesen werden, siehe Tabelle 13 und Abbildung 12 A und B. Hierbei handelte es sich um ein Tier aus Serie 4. Diesem waren die Fibroblasten per s.c.-Injektion appliziert worden.

Tabelle 13: Zellfunde Lymphknoten

Untersuchte Organe	20
Keine Zellen nachweisbar	19
Vereinzelte Zellen nachweisbar	1
Wenige Zellen nachweisbar	0
Viele Zellen nachweisbar	0

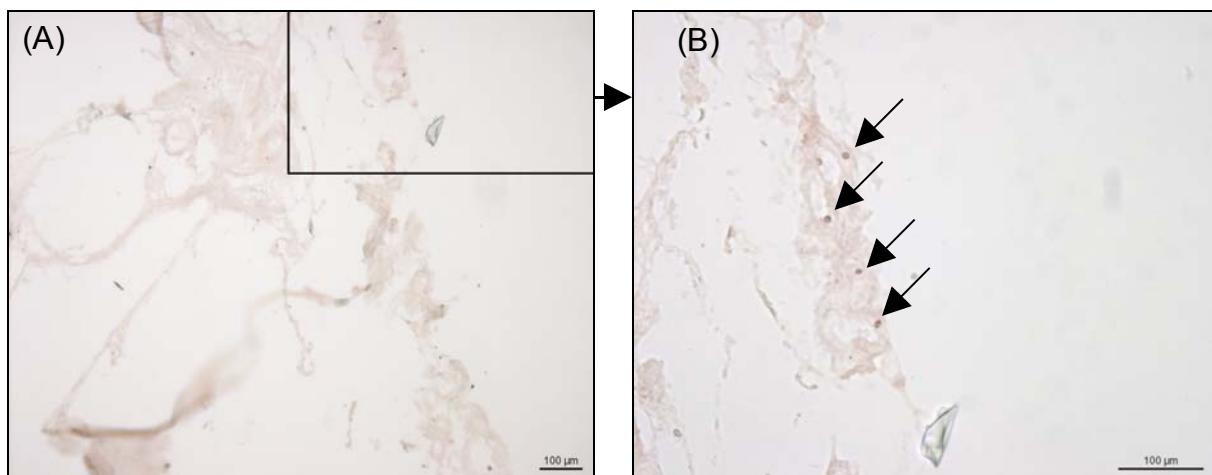


Abbildung 13: (A) Axialer Lymphknoten nach Anti-Vimentin-Färbung: Im oberen rechten Teil des Bildes sind humane RASF-Färbungen mittels Vimentin-Färbung sichtbar.

(B) Gleicher Schnitt wie Abb. 12 A in 20-facher Vergrößerung. Deutlich dargestellt sind multiple punktförmige positive Signale (siehe Pfeile).

1.7 Milz

Zur Aufklärung des Migrationsweges, z.B. über den Blutstrom, war die Milz durch ihren maschenartigen histologischen Aufbau und ihre Filterfunktion von besonderem Interesse. Bei sämtlichen 20 untersuchten Milzen konnten RASF im Stroma nachgewiesen werden (vergleiche Tabelle 14 und Abbildungen 13 A und B). Bei dem aus Serie 3 untersuchten Tier konnten nur vereinzelte Zellen nachgewiesen werden. Diesem Tier waren die RASF zusammen mit dem Knorpel implantiert worden. Die übrigen Milzen wiesen durchgehend Zellzahlen zwischen 10 und 50 pro Gesichtsfeld auf. Da diese Zellfunde in allen oben angeführten Mausserien auftraten, wurde auf eine Aufschlüsselung der Organe nach Applikationsarten der RASF verzichtet.

Tabelle 14: Zellfunde Milz

Untersuchte Organe	20
Keine Zellen nachweisbar	0
Vereinzelte Zellen nachweisbar	1
Wenige Zellen nachweisbar	19
Viele Zellen nachweisbar	0

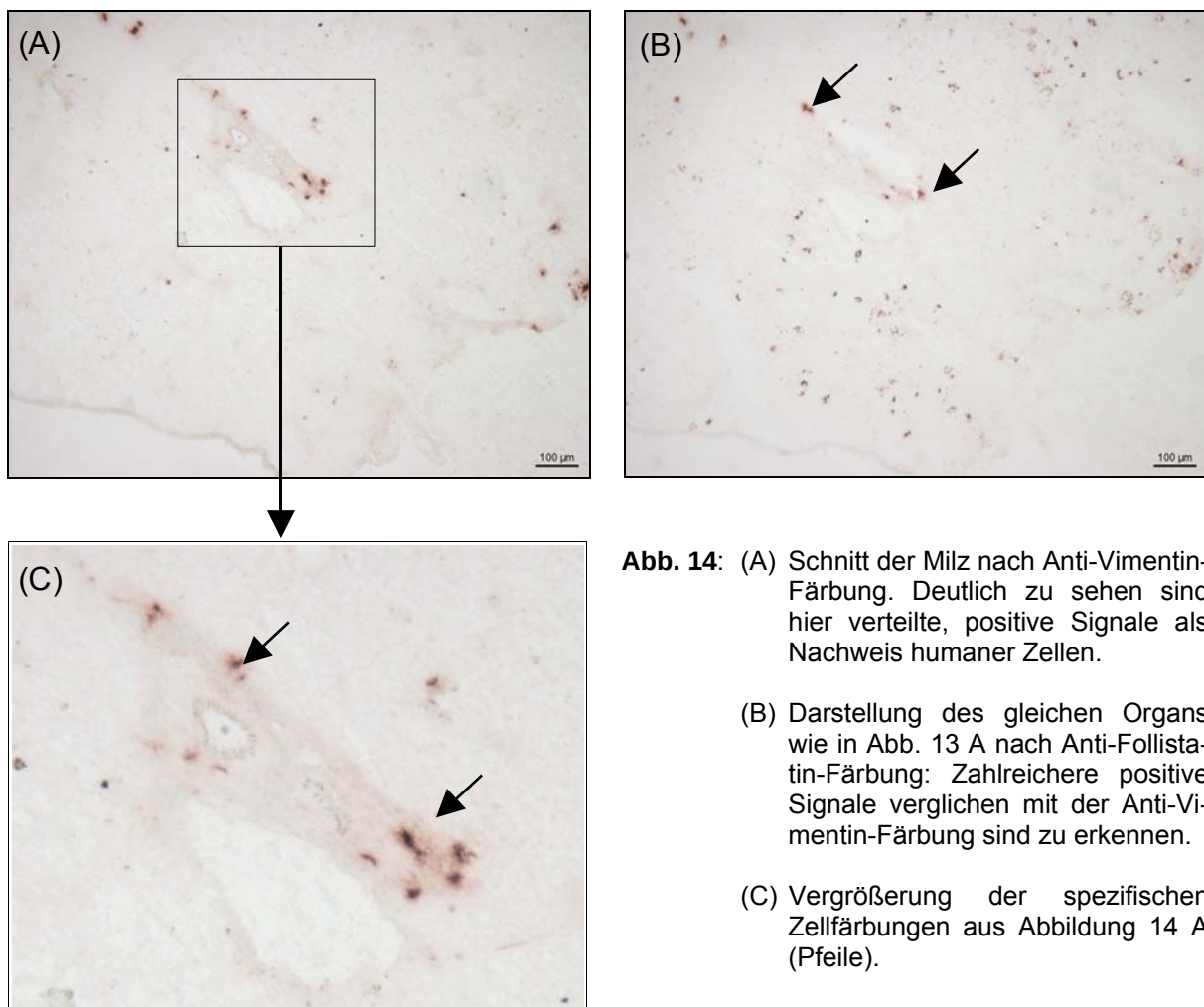


Abb. 14: (A) Schnitt der Milz nach Anti-Vimentin-Färbung. Deutlich zu sehen sind hier verteilte, positive Signale als Nachweis humaner Zellen.

(B) Darstellung des gleichen Organs wie in Abb. 13 A nach Anti-Follistatin-Färbung: Zahlreichere positive Signale verglichen mit der Anti-Vimentin-Färbung sind zu erkennen.

(C) Vergrößerung der spezifischen Zellfärbungen aus Abbildung 14 A (Pfeile).

1.8 Haut in Entfernung zum Implantat

Um einer möglichen subkutanen Migration, sei es durch die lokal zu den Implantaten gegebenen Zellen, subkutan oder anders applizierte RASF, nachzuweisen, wurde eine zusätzliche Hautprobe aus einem definierten Areal in einiger Entfernung der Implantationsorte entnommen. Jedoch konnte in sämtlichen untersuchten Hautschnitten aus implantatfernen Arealen kein Nachweis für eine RASF-Dissemination erbracht werden (siehe Tabelle 15 und Abbildung 14).

Tabelle 15: Zellfunde entfernt lokalisierter Haut

Untersuchte Organe	20
Keine Zellen nachweisbar	20
Vereinzelte Zellen nachweisbar	0
Wenige Zellen nachweisbar	0
Viele Zellen nachweisbar	0

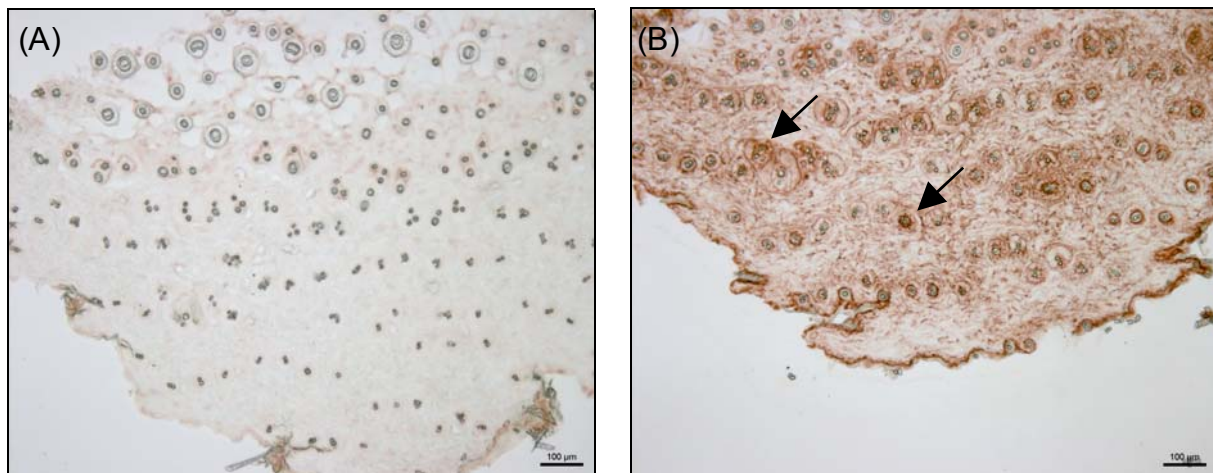


Abbildung 15: (A) Hautfärbung mittels Anti-Follistatin keine humanen Zellen nachweisbar.
(B) Positivkontrolle mittels Anti-H2-D^d-Färbung als Nachweis muriner Zellen/Gewebe. Deutlich färben sich die Haarfollikel an (Pfeile).

1.9 Haut in unmittelbarer Nähe des Implantats

Aus der über der Implantationsstelle gelegenen Haut wurde jeweils ein kleines Stück auf FibroblastenDisseminationen hin untersucht. Damit sollten Spuren von RASF gesucht werden, die aus der Nähe des Implantates in die Haut lokal eingewandert sein könnten. Hierbei konnten nur bei einem Organ aus Serie 4 vereinzelte Zellen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 16). Die RASF waren dem betreffenden Tier subkutan appliziert worden (siehe Abbildungen 15 A, C und D).

Tabelle 16: Zelfunde benachbarte Haut

Untersuchte Organe	20
Keine Zellen nachweisbar	19
Vereinzelte Zellen nachweisbar	1
Wenige Zellen nachweisbar	0
Viele Zellen nachweisbar	0

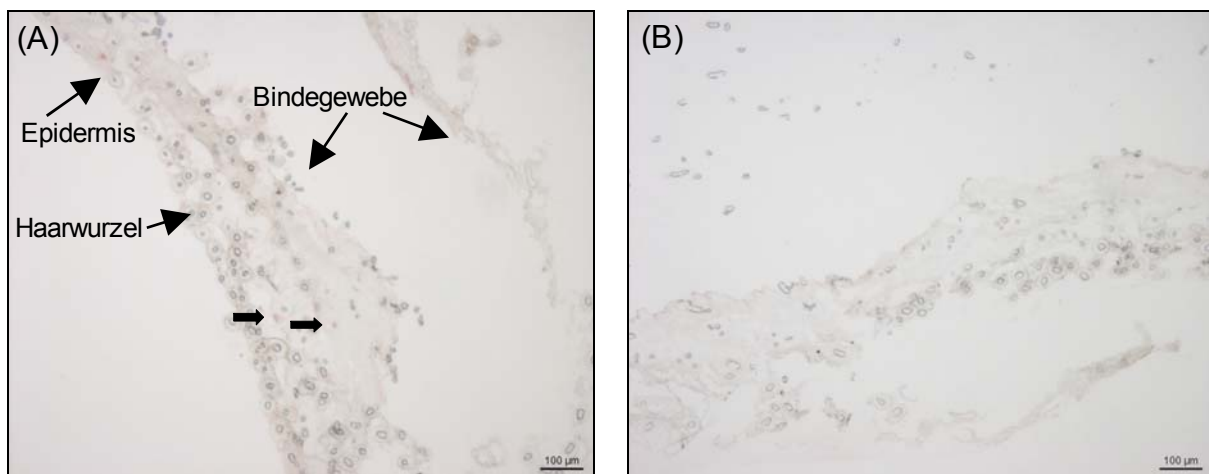
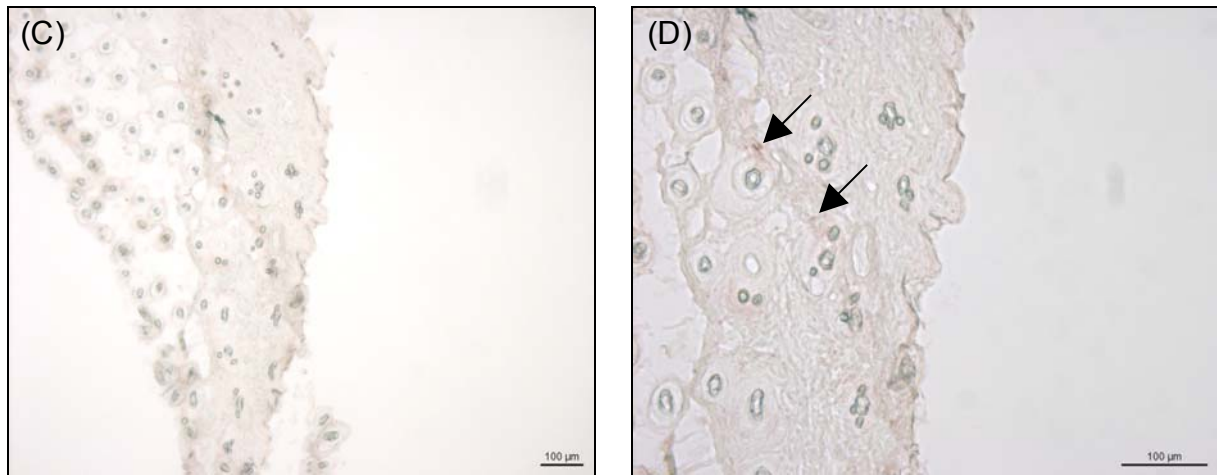


Abbildung 16: (A) Schnitt aus der Haut in der Nähe des Implantates aus Serie 4 nach der Anti-Follicular-Färbung. Zu erkennen ist die Epidermis mit zahlreichen angeschnittenen Haaren/Haarwurzeln sowie das darunterliegende Bindegewebe. Die gekennzeichneten Signale weisen auf humane RASF hin (Pfeile).
(B) Negative Isotypkontrolle in Serienschnitt des gleichen Organs. Reagenz- und Negativkontrolle waren ebenfalls negativ.



- (C) Leicht positive Signale in der Anti-Vimentin-Färbung gleicher Lokalisation wie in der Anti-Follistatin-Färbung zum Nachweis humaner RASF (siehe Abb. 16 A).
- (D) 20fache Vergrößerung der Anti-Vimentin-Färbung. Die vereinzelt positiven Signale sind mit Pfeilen hervorgehoben.

1.10 Ohr/Ohrknorpel

Die Invasion an und Degradation von murinem hyalinen Knorpel durch humane RASF im Knorpelwebe wurde am Knorpel des Ohres der SCID-Mäuse analysiert. Hierzu wurden bei allen Tieren die Knorpelstrukturen des Ohres auf RASF immunhistochemisch untersucht. RASF sind anscheinend in der Lage, an den Ohrknorpel der Maus zu adhären. In 8 von 20 Fällen konnte bei den untersuchten Mausohren der Nachweis für RASF erbracht werden. Im Einzelnen verteilten sich diese Zellfunde auf 6 Tiere, bei denen vereinzelt, also unter 10 Zellen, gefunden wurden (siehe Tabelle 19 und Abbildung 18), sowie auf zwei Tiere, bei denen die Zellzahl zwischen 10 und 50 (entspricht „wenigen Zellfunden“) lag. Bei den 6 Tieren, bei denen „vereinzelte Zellfunde“ festgestellt wurden, handelte es sich um drei Tiere, denen die RASF subkutan und zwei Tiere, denen die RASF intravenös appliziert worden waren. Das übrige Tier hatte die Zellen gleichzeitig zusammen mit dem Primärknorpel erhalten. Bei den zwei Versuchstieren, bei denen wenige Zellen gefunden wurden, waren in einem die Zellen zusammen mit dem Primärknorpel implantiert, bei dem anderen per sc-Injektion gegeben worden.

Tabelle 17: Zellfunde Ohrknorpel

Untersuchte Organe	20
Keine Zellen nachweisbar	12
Vereinzelte Zellen nachweisbar	6
Wenige Zellen nachweisbar	2
Viele Zellen nachweisbar	0

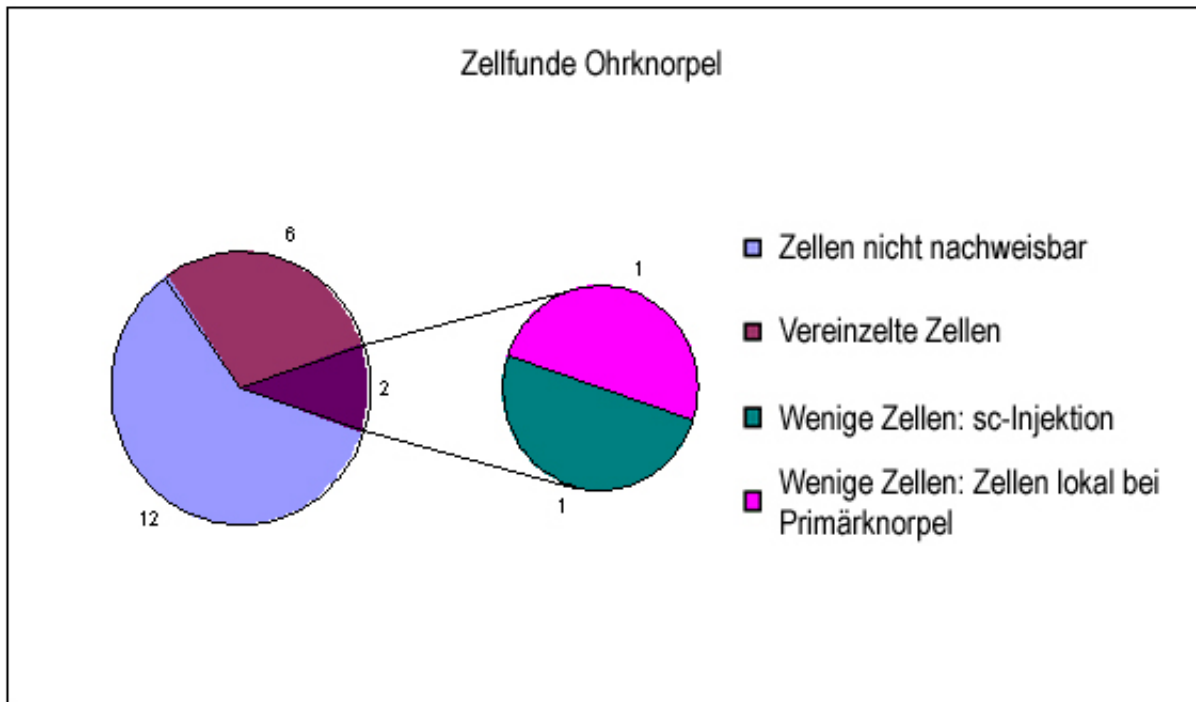


Abbildung 17: Insgesamt konnten bei 8 von 20 Tieren RASF gefunden werden. In 2 Fällen handelte es sich um wenige Zellen ($10 < x < 50$). Bei einem Tier waren die Zellen subkutan appliziert, bei dem anderen zusammen mit dem Primärknorpel implantiert worden.

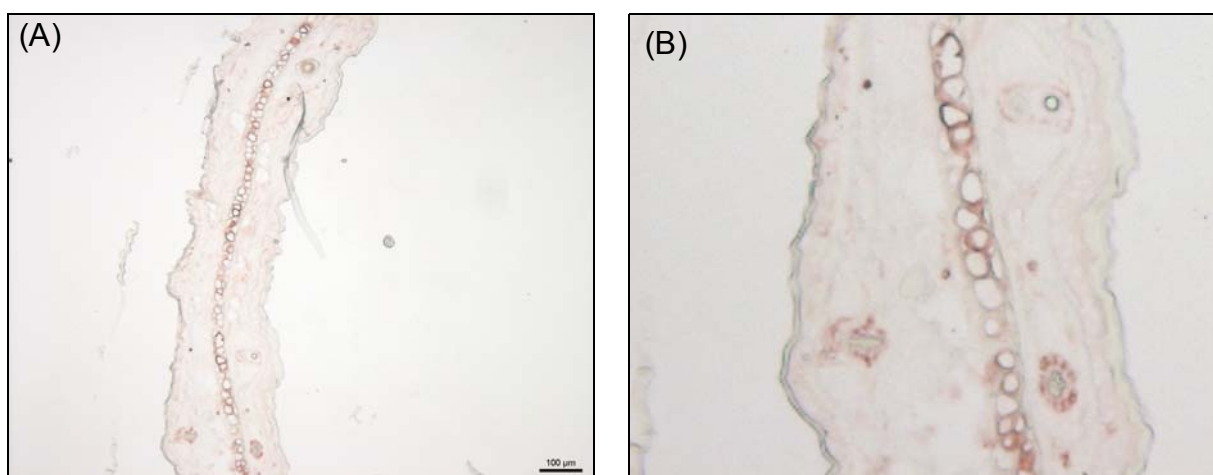


Abbildung 18: (A) RASF-Anlagerung frontal an den Ohrknorpel, in der Anti-Vimentin-Färbung.

(B) RASF-Nachweis mittels Anti-Follistatin-Färbung. Gleiches Färbeverhalten wie in Abb. 18 A.

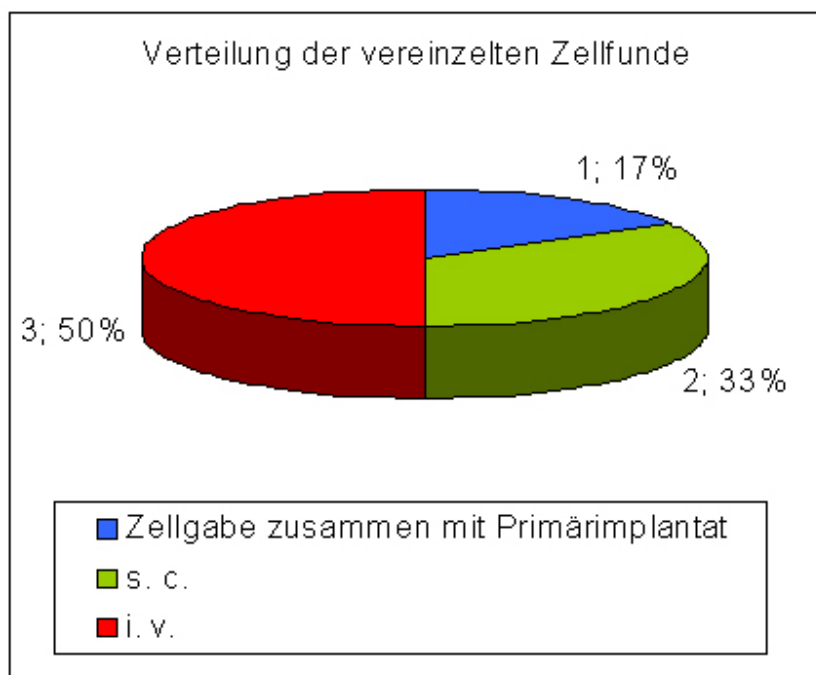


Abbildung 19: Verteilung der 6 vereinzeltten Zellfunde (≤ 10 Zellen): Die Zellfunde unter 10 Zellen teilen sich nach Applikation der RASF folgendermaßen auf: In 50 % der Fälle waren die Zellen subkutan gegeben worden. In 33 % der Fälle erfolgte die Gabe intravenös, in 17 % zusammen mit dem Primärimplantat.

1.11 Gelenk/Zehe

Die Mäusezehen mit Gelenk war für die Studie von besonderem Interesse. Das Gelenk als Ort der Hauptmanifestation der RA stellte auch bei der Maus eine wichtige Struktur dar, die es zu untersuchen galt. Bei den aus den Mauspfoten angefertigten Kryoschnitten gelang der Nachweis von RASF in zwei Fällen (Tabelle 18). Diese Zellfunde entstammten den Mausserien 5 und 6 (jeweils Injektionsserien, siehe Abb. 19).

Tabelle 18: Zellfunde Zehe/Gelenk

Untersuchte Organe	20
Keine Zellen nachweisbar	18
Vereinzeltte Zellen nachweisbar	1
Wenige Zellen nachweisbar	1
Viele Zellen nachweisbar	0

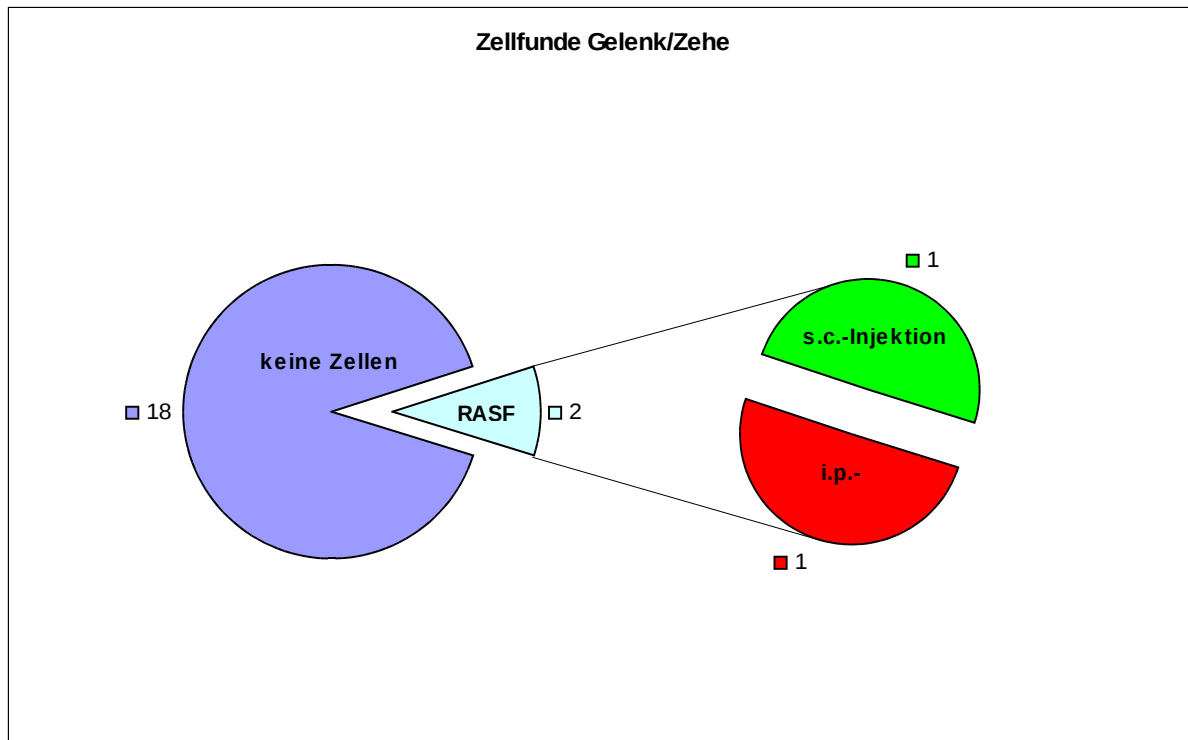


Abbildung 20: Der linke Kreis zeigt den Anteil positiv auf Zellfunde getesteter Mausepfoten. Der rechte Kreis stellt den Ursprung der bei den zwei Organfunden applizierten Zellen dar. Zu sehen ist, dass die Zellen, die insgesamt bei zwei Tieren nachweisbar waren, jeweils einer ip.- und sc.-Injektion entstammten. Die RASF, die in Serie 5 vereinzelt nachgewiesen werden konnten, entstammten einer intravenösen Injektion. Die zahlreichen in Serie 6 nachgewiesenen RASF entstammten einer subkutanen Injektion. Dabei wurden die in beiden Serien nachgewiesenen RASF jeweils in unmittelbarer Nähe des Knochens gefunden (vergleiche die vertikal angeordneten Zellen in Abb. 21).

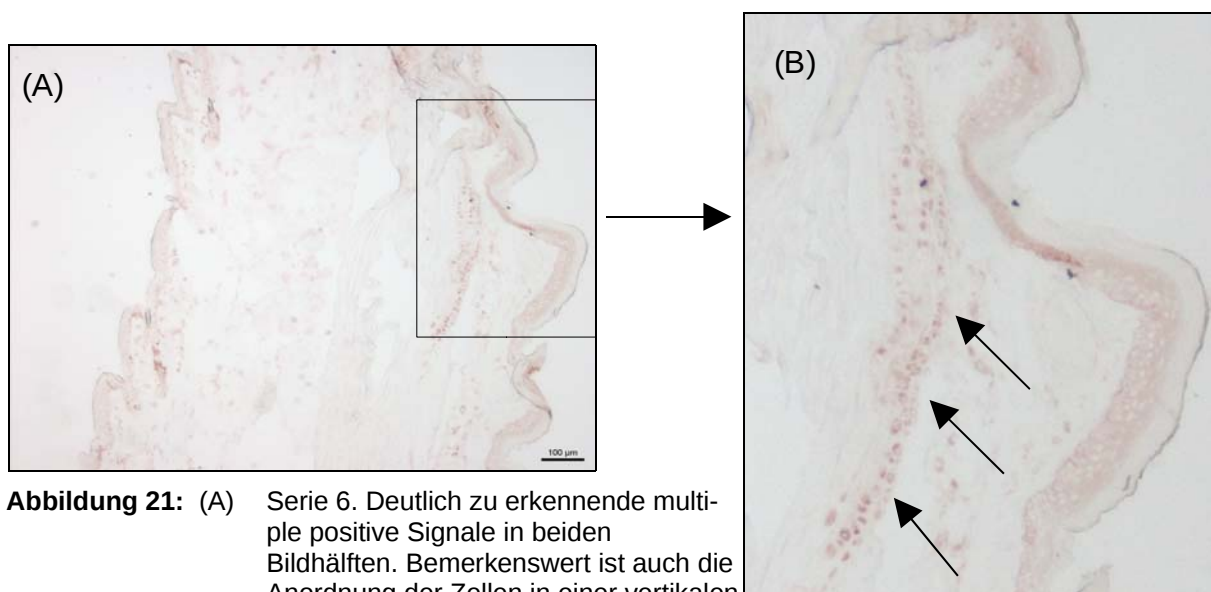


Abbildung 21: (A) Serie 6. Deutlich zu erkennende multiple positive Signale in beiden Bildhälften. Bemerkenswert ist auch die Anordnung der Zellen in einer vertikalen Reihe in der rechten Bildhälfte. (B) Ausschnittsvergrößerung des gleichen Organs. Es sind keine positiven Signale zu erkennen. Die Negativkontrolle blieb ohne spezifische Färbung. Dies deutet auf den humanen Ursprung der gefundenen Zellen hin.

2. Zellfunde im Blut

Neben der Untersuchung der soliden Organe bildete die Suche nach RASF im Blut der SCID-Mäuse, vor allem vor dem Gesichtspunkt einer möglichen Migration über den Blutweg der Tiere, eine wichtige Rolle. Für die Analyse des Blutes der SCID-Mäuse wurden Blutproben von insgesamt 42 Tieren der Serien 5-9 verwendet und mittels Zytospin die kernhaltigen Zellen auf Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden diese immunzytochemisch untersucht. Von den 42 untersuchten Präparaten waren die Präparate aus 2 Blutproben nicht auswertbar. Dies führte zu einer Gesamtzahl von 40 ausgewerteten Blutproben. In den 40 Präparaten gelang der Nachweis von RASF in 17 Fällen (siehe Tabelle 19 und Abbildungen 21, 22, 23). Dies entspricht 43%. 10 Zellfunde und damit 25% aller Blutproben stammen von Tieren, denen die RASF intravenös verabreicht worden waren (siehe Abbildung 35). 4 Zellfunde und damit 10% aller Blutproben lassen sich auf subkutane Zellgabe bei den betreffenden Mäusen zurückführen. Die übrigen 3 Versuchstiere, bei denen Zellen gefunden werden konnten, hatten die RASF per intraperitonealer Applikation erhalten.

Tabelle 19: Zellfunde Blut

Untersuchte Blutproben	42
Davon auswertbar	40
Positive Zellenachweise	17
Negative Zellenachweise	23

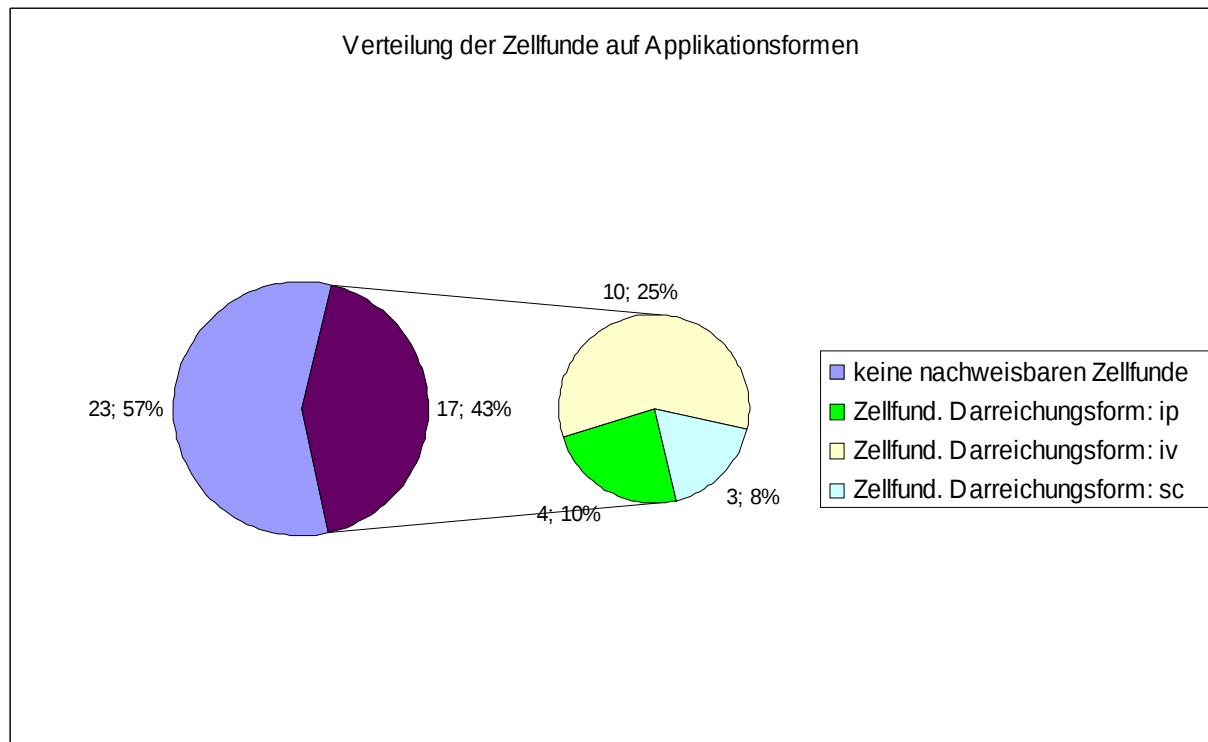


Abbildung 22: Verteilung der detektierten humanen RASF bezogen auf die Applikationsformen. 17 von 40 Blutproben waren positiv auf humane Zellen getestet worden. Von diesen 17 Proben entstammten 10 intravenös gespritzten Mäusen, 4 einer intraperitonealen Applikation, bei 3 Versuchstieren waren die RASF per subkutaner Injektion verabreicht worden.

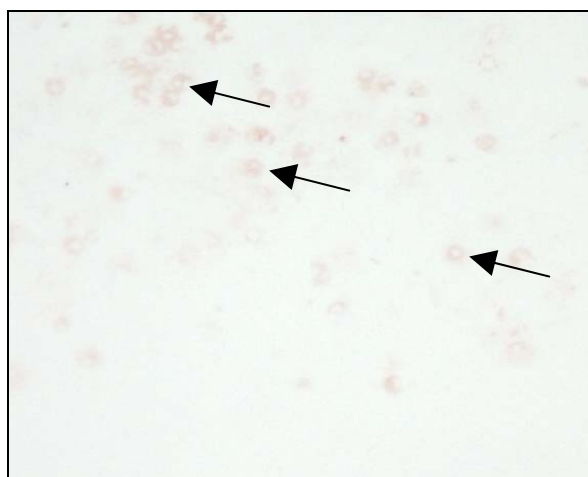


Abbildung 23: Mausblut. Murine Zellen in der H2-D^d Färbung als Positivkontrolle (Pfeile).

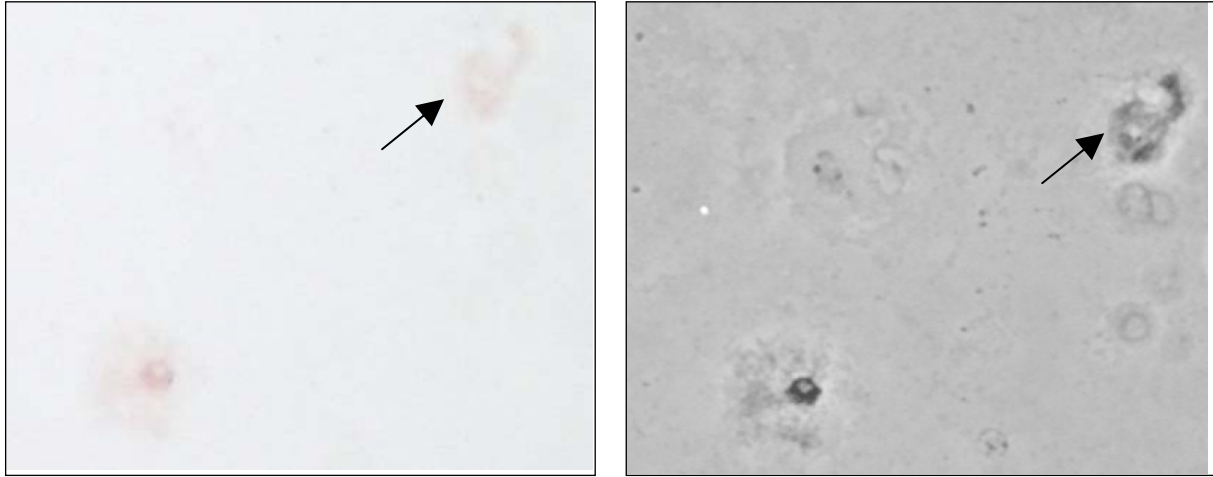


Abbildung 24: (A) Blutprobe nach Zytospin und nachfolgender Immunzutochemie mittels Anti-Vimentin-Färbung von RASF. Lichtmikroskopisch sind zwei gefärbte Zellen zu erkennen.

(B) Identischer Objektträger wie in Abb. 23 A. Im Phasenkontrastmikroskop sind Zellkern und Zytoplasma der RASF deutlich unterscheidbar (Pfeile).

V DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Frage, auf welchem Weg die dem humanen Gewebe entstammenden RASF innerhalb eines immundefizienten Versuchstieres (SCID-Maus) zu entfernt implantiertem humanen Knorpel migrieren. Die Fähigkeit der lokalen Migration ortsständiger Fibroblasten, sowohl physiologisch wie auch pathophysiologisch, ist bereits beschrieben worden (Lefèvre S et al, 2009). Beispielsweise ist bekannt, dass bei der Wundheilung in der Haut dermale Fibroblasten im Rahmen der Wundheilung eine prominente Rolle spielen. Hier bildet die Migration aktivierter Fibroblasten in die Umgebung der Verletzung einen zentralen Vorgang bei der Wundreparation (Leeb SN et al., 2004). Im Rahmen der idiopathischen Lungenfibrose wurde z.B. die integrinvermittelte Adhäsion an und Invasion in alveoläre Basalmembranen durch lokale Lungenfibroblasten festgestellt (White ES et al., 2003). Sämtliche bekannte Beispiele und Erkenntnisse für eine Migration der Gewebsfibroblasten umfassen jedoch lediglich die lokale, durch lokale chemotaktische Reize herbeigeführte Migration. In den bekannten Fällen findet die Migration und spätere Adhäsion an die Zielzellen oder geschädigten Matrixstrukturen nur über eine geringe, gewebständige Distanz statt. Vor dem Hintergrund der rheumatoiden Arthritis ist jedoch die Frage von Interesse, ob rheumatoide Fibroblasten aus einem betroffenen Areal, z.B. ausgehend vom Knorpel eines Gelenkes, in andere, fernere Areale desselben Gelenks oder sogar zu anderen Gelenken des Körpers migrieren können. Hierzu wäre jedoch eine weitaus größere Migrationsleistung erforderlich, als dies bisher für Fibroblasten beschrieben wurde.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde, wie in Abschnitt I beschrieben, immundefizienten Versuchstieren humaner Knorpel und RASF implantiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass humane Zellen durch den Versuchsorganismus gezielt in humanen Knorpel migrieren können (Neumann E et. al, 2004). Da das laterale KI zellfrei implantiert wurde, ist die einzige Erklärung für die invadierenden RASF und die Destruktion des humanen Knorpels die Migration der RASF aus dem primären Implantationsort heraus. Es bleibt jedoch offen, welche Mechanismen für diesen Vorgang eine Rolle spielen. Für eine Migration der RASF mit Verlassen eines KI durch den Versuchsorganismus hindurch und Invasion eines anderen KI müssen verschiedene gewebliche Barrieren überwunden werden. Ein Übertritt der RASF aus dem lokalen knorpelnahen Gewebsverbund in der Subkutantascche in die verschiedenen Gewebe

des Versuchsorganismus und die anschließende Invasion in das den lateralen KI umgebende Gewebe sind hierfür erforderlich.

Die gezielte Migration von Fibroblasten zu einem bestimmten Ort geschieht physiologisch meist als Antwort auf chemotaktische Reize. In der Wundheilung findet die Migration im Rahmen der sogenannten proliferativen Phase. Die wichtigen Schritte dieser Phase beinhalten Epithelialisierung, Angiogenese und vorläufige Matrixformierung. Hierbei wandern Fibroblasten aus dem umgebenden Gewebe in den Ort der Wundheilung ein. Als Hauptsignalstoffe für die Fibroblastenmigration und Aktivierung gelten der sogenannte „*Platelet derived growth factor*“ (PDGF) sowie „*Epithelial derived growth factor*“ (EGF) (Broughton G 2nd et al., 2006). Um auszuschließen, dass die Migration der RASF in Richtung des implantierten zellfreien humanen Knorpels als Antwort auf bei der Wundreparation beteiligte Reize durch die subkutane Implantation der KI stattfand, wurden im SCID-Maus-Modell die RASF erst nach Abschluss der frühen Phasen der Wundheilung appliziert. In den Serien 2 und 3 konnte durch zeitversetzte Implantation der primären, RASF-haltigen bzw. lateralen KI ohne RASF eine ähnlich starke Invasion und Knorpeldegradation durch die RASF nachgewiesen werden (Lefèvre S et al, 2009).

Aufgrund dieser Ergebnisse konnten Vorgänge der frühen Wundheilung und die damit einhergehenden Mediatoren als Effektor für die Fibroblastenmigration ausgeschlossen werden.

Durch Injektion der RASF 14 Tage zeitversetzt zur KI-Implantation konnte zusätzlich die Wundheilung bzw. offene Wunde als Migrationsursache der RASF zu den Implantaten ausgeschlossen werden. Weiterhin gab diese Variation des SCID-Maus-Modells erste Hinweise darauf, dass die Migration möglicherweise durch das Gefäßsystem stattfindet (Lefèvre S et al, 2009). Die Frage des Migrationsweges war aber durch die unterschiedlichen Implantationsversuche nicht geklärt und wurde in der vorliegenden Arbeit durch Untersuchung der Organe analysiert.

1. Detektion von RASF in murinen Organen

Um den Migrationsweg der RASF durch den murinen Organismus mit anschließender Invasion und Degradation des humanen Knorpels zu identifizieren, wurden die Organe der Versuchstiere untersucht. Hierzu wurde je ein Tier jeder untersuchten Serie auf Zellfunde in Organen und Blut mittels Immunhistochemie überprüft (s. Tabelle 5). In einer Reihe von Organen, wie beispielsweise im Verdauungstrakt oder der Lunge, konnten in allen Serien keine RASF nachgewiesen werden (vgl. IV: 1.1, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7). Im Gegensatz dazu waren RASF in verschiedenen anderen Geweben und Organen nachweisbar und gaben Aufschluss über den Migrationsweg.

Hierbei muss allerdings hinzugefügt werden, dass bei einer Fallzahl von 20 untersuchten Versuchstieren nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich nicht in den Organen anderer Tiere RASF befunden haben könnten. Es stellt sich die grundsätzliche Frage, ob der Nichtnachweis von Zellen in den Organen darauf beruht, dass die Zellen nicht an diese Orte migrierten, oder aber darauf, dass sie dort nur nicht überlebten oder am Tag 60, als die Migration möglicherweise abgeschlossen oder reduziert war, nicht mehr aufzufinden waren.

Der Zeitpunkt der Organentnahme bei Versuchsende könnte für falsch negative Zellfunde verantwortlich sein. Zwar wurden alle Organe im gleichen, definierten Zeitraum entnommen, jedoch handelte es sich bei diesem stets nur um eine Momentaufnahme. Eine Wanderung durch die betreffenden Organsysteme oder eine Dissemination vor dem 60. Tag kann nicht ausgeschlossen werden. Weiter ist es möglich, dass die RASF in Gewebe migrierten, jedoch dort vor der Detektion nach 60 Tagen im Rahmen der Immunabwehr durch neutrophile Granulozyten und das Monozyten-Makrophagen-System (MMS) eliminiert wurden. Die untersuchten Gewebe Lunge (Alveolarmakrophagen), Leber (Kupfer-Sternzellen), Haut (Langerhanszellen) sind bekannt für eine starke Präsenz an Zellen des MMS, was eine frühe Phagozytose der RASF ermöglichen könnte. Ebenfalls denkbar wäre eine frühe Apoptose der RASF nach der Migration in andere Organe. Möglicherweise fehlen in den entsprechenden Organen die Strukturen der extrazellulären Matrix, Autofluoreszenz oder das Zytokinmilieu, die für das Überleben der RASF notwendig sind. Zellen in Apoptose oder Phagozytose könnten sich durch Verlust von Proteinstrukturen der Antikörperbindung entziehen. Eine andere mögliche Fehlerquelle liegt in der Art der gewählten Detektionstechnik begründet. Obwohl zum Nachweis des humanen Ur-

sprungs der RASF zwei verschiedene Antikörper verwendet wurden, ist es vorstellbar, dass die Sensitivität der Immunhistochemie nicht ausreichte, um sämtliche RASF zu detektieren. Eine mögliche Alternative zur Immunhistochemie stellt die Immunfluoreszenzfärbung dar. Sie bietet eine höhere Sensitivität, geht allerdings auch mit einer geringeren Spezifität einher. Besonders humaner Knorpel zeigt hier eine starke Signalüberlagerung, weswegen diese Technik in diesem Experiment nicht zur Detektion verwendet werden konnte. Eine Untersuchungstechnik mit höherer Sensitivität und Spezifität wäre vielleicht dazu in der Lage, falsch negative Befunde der Immunhistochemie zu widerlegen.

1.1 Dünndarm

Bei keinem der untersuchten Dünndarmproben aus sämtlichen Serien wurde der Nachweis einer Dissemination von RASF erbracht. Dies betrifft auch die Proben der Tiere, bei denen die RASF intraperitoneal gespritzt wurden. Es ist zu vermuten, dass sich die RASF bei intraperitonealer Gabe entweder nur kurz in Darmabschnitten befanden oder einen Weg in den Blutkreislauf ohne Passage des Dünndarmes genommen haben. Es bleibt zu diskutieren, ob die nicht migrierten Zellen zugrunde gingen oder am Tag 60 vollständig den Intraperitonealraum verlassen hatten. Letzteres erscheint wahrscheinlicher, veranschaulicht man sich die hervorragende Blutversorgung des Dünndarmes, welche für die Resorption der Nahrungsbestandteile erforderlich ist. Da bei intraperitonealer Gabe eine signifikante Migration der RASF in den implantierten humanen Knorpel festgestellt wurde, ist anzunehmen, dass die Zellen auch über das Gefäßsystem des Dünndarms in den Blutkreislauf gelangten. Somit kann eine generalisierte Dissemination im Gastrointestinaltrakt bei sämtlichen Zellapplikationsformen ausgeschlossen und die Durchwanderung des Dünndarmes vermutet werden.

1.2 Herzmuskel, Leber, Lunge

In den Organen Herz, Lunge und Leber konnten keine RASF nachgewiesen werden. Sowohl Leber und Lunge werden von einem beträchtlichen Anteil des Herzminuten-

volumens durchströmt. Gleiches gilt für den Herzmuskel, der für den für die Blutzirkulation erforderlichen Druck verantwortlich ist. Es ist bekannt, dass im Verlauf der RA sowohl Herz- als auch Lungengewebe betroffen sein können (Specker C, 2006; Matucci-Cerinic M et al., 2006). Dem gegenüber der Normalbevölkerung erhöhten kardiovaskulären Risiko von Patienten mit RA wurde mit der Entwicklung neuer therapeutischer Richtlinien Rechnung getragen (Pham T et al., 2006). Dies lässt vermuten, dass entsprechende Adhäsions- und Invasionsmechanismen existieren, die beim Menschen einen Befall dieser Organe, möglicherweise durch RASF, vermitteln. Im Rahmen einer Organbeteiligung wäre auch unter diesem Aspekt eine Invasion der in diesem Experiment applizierten Fibroblasten vorstellbar gewesen. Gleichwohl wurden in diesen drei Organen keine humanen Zellen gefunden.

Das Herz als den Blutkreislauf antreibender Muskel spielt eine zentrale Rolle in der Hypothese einer Fibroblastenmigration über die Zirkulation. Die Anheftung oder Einwanderung von RASF in Gewebe des Herzmuskels wäre in Anbetracht der in den Herzhöhlen vorherrschenden Blutströmung bzw. Blutdrücke erschwert. In Leber- und Lungengefäßen liegen dagegen geringere Drücke vor. Beiden Organen fällt eine für den Organismus wichtige Filter- bzw. Entgiftungsfunktion des Blutes zu. Jedoch scheint auch hier der adäquate Reiz für einen Übertritt der RASF in das Parenchym zu fehlen oder die humanen Zellen werden durch Phagozytose und/oder Induktion von Apoptose aus dem Gewebe entfernt. Ein nicht zu vernachlässigendes Problem in Bezug auf eine Interpretation der Zellfunde liegt in der Nachweisttechnik begründet. Durch die in Abschnitt II.3.3 ausgeführte Technik der Immunhistochemie an Gefrierschnitten und die damit verbundene mehrfache Behandlung mit den erforderlichen Lösungen ist es meist nicht möglich, humane oder murine Blutzellen in Herzhöhlen oder Gefäßen nachzuweisen. Sämtliche sich in den Lumen befindlichen Zellen und Blutbestandteile werden im Verlauf der Färbungen ausgespült. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich zum Zeitpunkt der Organentnahme humane Zellen in den Gefäßen der Organe befunden haben. In den enthaltenen Gefäßen des Herzmuskels, der Leberläppchen und des Lungengewebes sowie in den Alveolen konnten keine RASF in den analysierten Präparaten nachgewiesen werden. Im Stroma des Leber- und Herzgewebes konnten ebenso keine RASF detektiert werden. Ein Übertritt von RASF in diese Organe scheint im Verlauf der Fibroblastenmigration über den Blutstrom nicht zu erfolgen. Selbst bei Eliminierung der RASF vor der Organentnahme durch Phagozytose oder Apoptose hätten sich zumindest einzelne

RASF nachweisen lassen müssen. Das völlige Fehlen humaner Zellen im Gewebe derart stark durchbluteter Organe wie Herz, Leber und Lunge schließt eine generalisierte Dissemination der den Versuchstieren applizierten RASF nahezu aus. Im Umkehrschluss lassen diese Ergebnisse die gezielte Migration durch das Gefäßsystem wahrscheinlich erscheinen.

1.3 Niere

Wenige RASF konnten in einer von 20 überprüften Nieren nachgewiesen werden. Die positiven Signale fanden sich an tubuläre Strukturen der Nierenrinde angelagert. Eine Durchwanderung des Nierenparenchyms durch die RASF scheint jedoch ebenso unwahrscheinlich wie ein Durchtritt der RASF durch die den Tubuli vorgeschalteten Nierenkörperchen. Weiterhin konnten bei keinem weiteren Tier humane Zellen in den Nieren nachgewiesen werden. Eine Erklärung für die Detektion von RASF in einer Niere ist möglicherweise in Mikroläsionen der Niere in diesem Tier zu suchen.

1.4 Milz, Lymphknoten

Die Milz ist ein zentrales Organ des Immunsystems. In der immundefizienten SCID-Maus besitzt die Milz im Rahmen der passiven Erregerabwehr (angeborenes Immunsystem) eine zentrale Rolle. Durch die maschenartige Parenchymstruktur wird das Blut gefiltert und dient dem Abbau überalterter Blutzellen, Erreger und Immunkomplexe aus dem Blut.

Mit Ausnahme eines Tieres, bei dem wenige RASF detektiert wurden, konnten in allen Milzgeweben RASF in hoher Zahl nachgewiesen werden. Dabei spielte die Applikationsart der RASF keine Rolle. Die detektierten humanen Zellen wurden vermutlich in der Milz während der Blutpassage durch die Milz ausgefiltert und im Parenchym zurückgehalten. Ein Fund von RASF in der Milz setzt jedoch bei allen Fibroblasten, welche nicht im Rahmen des „Injektionsmodells“ intravenös appliziert wurden, einen vorhergehenden Übertritt der humanen Zellen in den Blutkreislauf voraus. Dieses Ergebnis ist vor allem überraschend, da von der Häufigkeit der Zellfunde im Milzgewebe nicht auf die Applikationsart geschlossen werden konnte. Die intravenöse Injekti-

on von RASF resultierte in einer ähnlich hohen Zahl von RASF in der Milz an Tag 60 wie beispielsweise nach subkutaner Injektion. Was die Zellen zum Übertritt aus den lokalen Applikationsorten in den Blutkreislauf animiert haben könnte, kann im Rahmen dieser Studie nicht beantwortet werden. Chemotaxis und endotheliale Oberflächenproteine wären zwei mögliche Ansätze zur Aufklärung des hier beobachteten Phänomens. Darüber hinaus bleibt in weiteren Versuchen zu zeigen, wann der Übertritt der RASF in das Gefäßsystem während der 60 Tage Beobachtungszeit stattfindet und ob die RASF in der Milz überleben oder ob sie phagozytiert werden.

In den untersuchten axialen Lymphknoten konnten in einem einzigen Präparat vereinzelte Zellen nachgewiesen werden. Dies ist allerdings bei nur einem getesteten Lymphknoten pro SCID-Maus angesichts der Vielzahl von Lymphknoten ein interessantes Ergebnis. Weiterhin sind in den immundefizienten Tieren die Lymphknoten im Vergleich zu immunkompetenten Tieren deutlich atrophiert und unterscheiden sich in ihrem Aufbau, da SCID-Mäuse keine funktionellen T- und B-Zellen bilden können. Die bei dem Versuchstier gefundenen Zellen entstammen einer subkutanen Injektion. Ob diese Zellen direkt über die Lymphbahn oder aus dem Blut in die Lymphknoten gelangt sind, kann nicht beantwortet werden. Allerdings ist für beide Varianten eine Migration der Zellen aus dem Subkutangewebe heraus Voraussetzung. Angesichts der übrigen Ergebnisse aus den Organuntersuchungen erscheint eine mögliche Migration der RASF über die Lymphbahn sehr unwahrscheinlich. Es wäre jedoch möglich, dass dieselben Mechanismen, die den RASF erlauben, an Blutgefäße zu adhären, diesen auch den Übertritt in die Lymphgefäße ermöglichen. Weitere Analysen hinsichtlich der bei der Fibroblastenmigration beteiligten Faktoren sind notwendig, um diese Fragen zu beantworten.

1.5 Subkutane Hautproben

Der Nachweis von RASF in entnommenen Hautproben bzw. in unmittelbarer Nähe der KI oder in entfernten Arealen konnte nur in einem Präparat erbracht werden (Abb. 13). Dieses Ergebnis macht die mögliche Hypothese einer subkutanen Wanderung unwahrscheinlich. In einem aus insgesamt 20 Hautpräparaten aus der unmittelbaren Nähe des KI konnten RASF detektiert werden. Daher ist anzunehmen, dass die RASF überwiegend die Applikationsstelle verlassen, anstatt das umliegende subkutane Gewebe zu infiltrieren oder zu durchwandern. Wie in Abschnitt IV.2 dargelegt, konnten RASF im Blut von Mäusen nachgewiesen werden, denen RASF per subkutaner Injektion verabreicht worden waren. Das Fehlen von Zelfunden in allen anderen Hautpräparaten unterstützt die zuvor geäußerte Hypothese einer gezielten Migration der humanen RASF über das Gefäßsystem und schließt die subkutane Migration zwischen den Implantaten nahezu aus. Ob zu früheren Zeitpunkten nach RASF-Applikation humane Zellen subkutan nachweisbar wären, bleibt ungeklärt. Zu vermuten wären in diesem Fall Zelfunde in der Umgebung subkutan gelegener Blutgefäße. Eine Versuchsreihe subkutan injizierter RASF in SCID-Mäuse, verbunden mit einem Nachweis der RASF im Bereich der subkutanen Injektionsstelle und im Blut sowie die Analyse von verschiedenen Zeitpunkten könnte den Migrationsweg der Zellen aufzeigen und die Kinetik der Migration von RASF darlegen.

1.6. Murine Gelenke und Ohrknorpel

Das Gelenk und die gelenkbildenden Strukturen als einer der Hauptmanifestationsorte der rheumatoiden Arthritis wurden vor allem unter der Fragestellung der Invasion von RASF in intakte Gelenke untersucht. Aus vorhergehenden Experimenten ist bekannt, dass RASF murinen Knorpel invadieren können (Levèfre S et al., 2008). Die Einbringung humaner RASF in immundefiziente Tiere anderer Spezies und einer sich daraus entwickelnden arthritischen Reaktion wurde bislang allerdings nicht beschrieben. Da die RASF, wie mit Hilfe des „klassischen Modells“ gezeigt, humanen Knorpel in vivo destruieren, war die Möglichkeit vorstellbar, dass sie in das Gelenk der Maus einwandern, dort an Strukturen des Bewegungsapparates adhären und den Knorpel invadieren und destruieren. Allerdings besitzt das intakte murine Gelenk natürliche Gewebsbarrieren, die die Migration von RASF verhindern können. Weiterhin ist im gesunden Gelenk eine räumliche Trennung des Synovialgewebes und der Knorpelmatrix gegeben, die zur erschwerten Migration und Adhäsion der RASF an die Knorpelmatrix führen könnte.

In der Tat konnten nur in zwei Tieren RASF im intakten murinen Gelenk am Tag 60 detektiert werden (s. Tabelle 18). Diese waren auffälligerweise, wie in Abb. 19 ersichtlich, nicht im gesamten Gelenk verteilt, sondern entlang der dort vorhandenen knöchernen Strukturen angelagert. Eine Destruktion der knorpeligen Gelenksanteile konnte allerdings nicht festgestellt werden. Diese Beobachtung lässt eine gezielte Migration der RASF wahrscheinlicher erscheinen. Allerdings stellt das völlige Fehlen humaner Zellen in den übrigen Gelenken diese wiederum in Frage.

Möglicherweise reicht der Beobachtungszeitraum der RASF von 60 Tagen in der SCID-Maus nicht aus, um die natürlichen, intakten Gelenkbarrieren im Tier zu überwinden und den RASF zu ermöglichen, aus dem Gefäßsystem auszutreten, in das Synovialgewebe zu migrieren und an die räumlich getrennte Matrix zu adhären. Ein weiteres SCID-Maus-Experiment hat allerdings gezeigt, dass RASF prinzipiell in der Lage sind, speziesfremden Knorpel zu invadieren, wenn das Gelenk durch Implantation den RASF zugänglich gemacht wird (Levèfre S et al., 2008). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die räumliche Trennung die Invasion verlangsamt, was mit dem langsam voranschreitenden klinischen Bild beim RA-Patienten übereinstimmt.

In sechs von 20 Tieren konnten einzelne, in zwei weiteren Tiere wenige, RASF nachgewiesen werden. Die Zellen lagen hierbei am Knorpel an, auch eine Invasion und Zersetzung konnte beobachtet werden.

Angesichts der hohen Zahl detektierter RASF im Bereich des Ohrknorpels der SCID-Mäuse drängt sich die Frage nach der speziesfremden Adhäsion humaner RASF an murinen Knorpel auf. Bei annähernd der Hälfte der Versuchstiere konnten an die Knorpelmatrix angelagerte RASF nachgewiesen werden. Wie in Abb. 31 ersichtlich, bezog sich die Herkunft der Zellen auf sämtliche verwendete Applikationsformen der RASF. Offenbar stellt auch der Knorpel des Mausohres einen Zielort für eine gerichtete Migration der RASF dar. Als Ursache für diese Beobachtung ist die strukturelle Ähnlichkeit des im Ohr des Versuchstieres vorliegenden Knorpelgewebes mit humanem Gelenkknorpel zu diskutieren. Allerdings wurde der Knorpel im Ohr nicht invadiert, was auf Unterschiede in der Matrixzusammensetzung, auf eine intakte oder zum Gelenkknorpel unterschiedlichere Beschaffenheit der Knorpeloberfläche oder auf fehlende aktivierende Faktoren hinweist. Ein Vergleich der im Ohr vorherrschenden Verhältnisse mit denen in einem Gelenk ist jedoch nicht ohne Weiteres möglich. Prinzipiell scheinen RASF murinen Knorpel invadieren zu können. Dies stimmt mit den Ergebnissen weiterer Experimente der Arbeitsgruppe überein, bei denen muriner Gelenkknorpel subkutan implantiert wurde und eine Invasion durch RASF festgestellt werden konnte (Lefevre S et al. 2009). Im Unterschied zu den räumlich getrennten Kompartimenten des intakten Gelenkes liegt der Ohrknorpel im direkten Kontakt mit dem umliegenden Gewebe und ist daher für migrierende RASF zugänglich. Auch ist das den Ohrknorpel umgebende Gewebe deutlich besser durchblutet, als es beim Gelenkknorpel in einer abgeschlossenen Gelenkkapsel der Fall ist. Basierend auf der Hypothese einer Fibroblastenmigration über den Blutweg könnte in der geringeren Blutversorgung der Gelenke gegenüber dem Ohrknorpel die Erklärung für eine erhöhte Migration der RASF zum Ohrknorpel liegen. Durch die fehlende Gelenkkapsel beim Ohrknorpel könnte weiterhin die Fibroblastenadhäsion erleichtert sein. Wenn RASF Matrixproteine zur Adhäsion benötigen, ist es denkbar, dass im Falle der geschlossenen Gelenkkapsel der Gelenkknorpel für RASF deutlich unzugänglicher wäre.

2. Fibroblastenfunde in Blutproben

Wie in Teil IV.2 beschrieben, wurden humane RASF im Blut von 17 aus 42 Versuchstieren detektiert. Die hohe, allerdings nicht 100-prozentige Quote positiver Zellaufweise könnte irreführend sein, da zu vermuten ist, dass die tatsächliche Zahl für humane Zellen bei positiven Versuchstieren höher liegt. Die Ursachen für diese Vermutung liegen in mehreren, experimentellen und die Technik der Zelldetektion in dem Blut der Versuchstiere betreffenden Aspekten begründet.

Zum einen betrug das den SCID-Mäusen entnommene Blutvolumen mit bis zu maximal 1 ml nur einen maximal ca. 50-prozentigen Anteil des Gesamtblutvolumens. Oftmals standen jedoch 150-500 µl Blut zur Verfügung. Da jedoch anzunehmen ist, dass sich die Zellen im gesamten Blutvolumen gleichmäßig verteilen, kann das entnommene Probenvolumen nur als zufällige Stichprobe in einer für eine ausreichende Signifikanz zu kleinen Fallzahl angesehen werden. Des Weiteren wurden die entnommenen Blutproben stark verdünnt. Diese Verdünnung war erforderlich, um die Überlagerung der wenigen humanen Zellen durch murine Erythrozyten und andere murine Blutzellen zu vermindern, die trotz wiederholter Erythrozytenlyse nicht komplett entfernt werden können. Während der Prozedur können zusätzlich humane Zellen verloren werden. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die Blutzellen, die am Tag 60 nach der Aufarbeitung und der immunzytochemischen Färbung in den Zytospins beurteilt wurden, immer nur Momentaufnahmen zu Versuchsende darstellten. Es muss davon ausgegangen werden, dass 60 Tage nach RASF-Applikation die überwiegende Zahl humaner Zellen migriert und aus den Blutgefäßen bereits ausgetreten war. Somit waren die RASF weitgehend nicht mehr im Blut nachweisbar. Neuere Versuche der Arbeitsgruppe zeigten, dass eine Invasion des zellfreien Implantats bereits nach 18 Tagen nachweisbar ist (Zimmermann B et al., 2009). Demnach findet die Migration der RASF bereits vor diesem Zeitraum statt.

Die Untersuchungen der den SCID-Mäusen entnommenen Blutproben unterstützen die Migrationshypothese über das Gefäßsystem. In einem hohen Anteil der untersuchten Blutproben konnten 60 Tage nach Implantation humane RASF nachgewiesen werden. Von den Blutproben, in denen RASF detektiert werden konnten, bildete die der intravenös applizierten RASF die größte Fraktion. Allerdings fanden sich in signifikanter Anzahl auch aus subkutaner bzw. intraperitonealer Applikation hervorgegangene humane Fibroblasten. Diese positiven Zellfunde im Blut der Versuchstiere kön-

nen nur mit einem Übertritt der RASF von ihrem Applikationsort in das Gefäßsystem erklärt werden. Die Mechanismen des Gefäßübertrittes der RASF aus dem Gewebe sind bisher nicht bekannt.

Die Anheftung von RASF an Knorpel- und Knochenstrukturen stellt eine Bedingung für das aggressive Verhalten dar, das sich in der Bildung und Abgabe proteolytischer Enzyme und Degradation der EZM niederschlägt (Schedel J et al., 2004). Die Erforschung dieser Mechanismen steht derzeit nicht zur Verfügung, würde jedoch zum Verständnis der Interaktion von RASF mit den Zellen des Blutgefäßsystems beitragen.

3. Interpretation der nachgewiesenen RASF in den Organen

RASF waren in verschiedenen Geweben und Organen nachweisbar und gaben Hinweise auf den Migrationsweg. Hierbei muss allerdings hinzugefügt werden, dass bei einer Fallzahl von 20 untersuchten Versuchstieren nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich nicht in den Organen anderer Tiere RASF befunden haben könnten. Es stellt sich die grundsätzliche Frage, ob der Nichtnachweis von Zellen in den Organen darauf beruht, dass die Zellen nicht an diese Orte migrierten, oder aber darauf, dass sie dort nicht überlebten oder am Tag 60, als die Migration möglicherweise abgeschlossen oder reduziert war, nicht mehr aufzufinden waren.

Der Zeitpunkt der Organentnahme bei Versuchsende könnte für falsch negative Zellfunde verantwortlich sein. Zwar wurden alle Organe im gleichen, definierten Zeitraum entnommen, jedoch handelte es sich bei diesem stets nur um eine Momentaufnahme. Eine Wanderung durch die betreffenden Organsysteme oder eine Dissemination vor dem 60. Tag kann nicht ausgeschlossen werden.

Weiterhin ist es möglich, dass die RASF in Gewebe migrierten, jedoch dort vor der Detektion nach 60 Tagen im Rahmen der Immunabwehr durch neutrophile Granulozyten und das Monozyten-Makrophagen-System (MMS) eliminiert wurden. Insbesondere in Lunge (Alveolarmakrophagen), Leber (Kupfer-Sternzellen) und Haut (Langerhanszellen) liegen viele Zellen des MMS vor, was eine frühe Phagozytose der RASF ermöglichen könnte.

Ebenfalls denkbar wäre eine frühe Apoptose der RASF nach der Migration in Organe. Möglicherweise fehlen in den entsprechenden Organen die Strukturen der extra-

zellulären Matrix, Zellinteraktionen oder das Zytokinmilieu, die für das Überleben der RASF notwendig sind. Zellen in Apoptose oder phagozytierte Zellen könnten durch Verlust von Proteinstrukturen der Antikörperbindung immunhistologisch nicht mehr nachweisbar sein.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle liegt in der Art der gewählten Detektionstechnik begründet. Obwohl zum Nachweis des humanen Ursprungs der RASF zwei verschiedene Antikörper verwendet wurden, ist es vorstellbar, dass die Sensitivität der Immunhistochemie nicht ausreicht, um sämtliche RASF zu detektieren. Eine mögliche Alternative zur Immunhistochemie stellt die Immunfluoreszenzfärbung dar. Sie bietet eine höhere Sensitivität, geht allerdings auch mit einer geringeren Spezifität einher. Besonders humaner Knorpel und die implantierte Trägermatrix weisen eine starke Signalüberlagerung durch Autofluoreszenz auf, weswegen diese Technik in diesem Experiment nicht zur Detektion verwendet werden konnte. Eine Untersuchungstechnik mit höherer Sensitivität und Spezifität wäre dazu in der Lage, falsch negative Befunde der Immunhistochemie zu widerlegen.

Insgesamt weisen die vorliegenden Versuche in Zusammenschau mit weiteren Experimenten der Arbeitsgruppe (Lefevre S et al. 2009) darauf hin, dass die Migration der RASF im SCID-Maus-Modell der RA durch das Gefäßsystem stattfindet.

4. Ausblicke

Mit Hilfe des in-vivo-Mausmodells konnte die Migrationsfähigkeit aus humanem Synovium isolierter rheumatoider synovialer Fibroblasten dargestellt werden (Lefèvre S et al., 2009). In Abwesenheit einer adaptiven Immunabwehr und von weiteren humanen Effektorzellen und Zytokinen sind die humanen RASF in der Lage, implantierten gesunden humanen Knorpel zu invadieren und zu destruieren. Dies unterstützt die Hypothese, dass T-Zell-unabhängige Signalwege eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der RA spielen und die RASF für die kontinuierliche Destruktion von Knochen und Knorpel verantwortlich sind (Müller-Ladner U et al., 2007). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RASF nur in bestimmten Organen der Versuchstiere präsent sind. Dabei trat jedoch keine Dissemination der RASF in den murinen Organen auf. Vielmehr deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine gezielte Migration der RASF über den Blutweg zum implantierten Knorpel stattfindet.

Die Hauptmanifestation der RA besteht aus einem sich progredient ausbreitenden Befall und Zerstörung von Gelenkstrukturen. Initial sind dabei nur einzelne Gelenke betroffen, bis sich die Erkrankung im Verlauf in mehreren anderen Gelenken manifestiert. Es stellt sich die Frage, ob die im Rahmen des SCID-Maus-Modells erarbeitete Migrationshypothese der RASF zur Erklärung der Progredienz der RA beiträgt. Die Ergebnisse aus dem Tiermodell sind nur bedingt auf den Menschen übertragbar. Die RA beim Menschen vollzieht sich vor dem Hintergrund eines aktiven bzw. überreaktiven Immunsystems. Dabei greifen unzählige weitere Faktoren, sei es auf zellulärer oder molekularer, somatischer oder psychischer Ebene in das Krankheitsgeschehen ein. So stellt das von rheumatoider Arthritis betroffene Gelenk ein einzigartiges Umfeld dar. Das entzündete Synovialgewebe von Patienten mit RA enthält eine Vielzahl an Chemokinen und Zytokinen sowie EZM-Bestandteilen. Daher wird möglicherweise die Auswanderung von RASF aus dem entzündeten Mikromilieu erschwert. Andererseits ist das RA-Synovium durch eine erhöhte Neoangiogenese gekennzeichnet (Szekanecz Z et al., 2007). Die erhöhte Gefäßdichte und das aktivierte Endothel ermöglichen und fördern eventuell die Auswanderung der RASF. Weiterhin sind Entzündungsfaktoren auch im Serum der betroffenen Patienten erhöht, die als Chemoattraktanden für RASF fungieren könnten.

Durch die Erosion der Knorpel- und Knochenflächen und der daraus resultierenden Reibung der Gelenkflächen aneinander sowie durch den über die Gelenkflächen

wachsenden Pannus findet ein ständiger Umbau des Synoviums mit Bildung von Wundheilungsgewebe statt. Dieses Gewebe ist stark durchblutet und könnte die Auswanderung von RASF erleichtern. Anders als die im SCID-Maus-Modell subkutan bzw. intravenös oder lokal an die KI applizierten RASF ist der Zugang zum Blutkreislauf für sich im Gelenk befindliche Zellen ungleich erschwert. Andererseits verläuft die humane RA über Jahre. Wenn die aufgestellte Hypothese stimmt, dass synoviale Fibroblasten in der RA zur Ausbreitung auf weitere Gelenke verantwortlich sind, würde bei einfachem Zugang ein schneller Verlauf unter Einbezug aller Gelenke zu erwarten sein. Wie im Tiermodell gezeigt, scheinen jedoch intakte Gelenkstrukturen die Gelenke weitgehend zu schützen. Hierbei wäre zu diskutieren, ob Mikroläsionen in der Gelenkkapsel und in den das Gelenk umgebenden Strukturen die Migration fördern bzw. ermöglichen. Für diese Theorie spricht auch die Tatsache, dass Bestandteile und Bruchstücke der ECM selbst chemoattrahierend auf RASF wirken können (Müller-Ladner U et al., 2005).

Insgesamt sind an den Prozessen, die letztendlich zur Migration der RASF führen, viele verschiedene Faktoren beteiligt. Hierzu zählen vermutlich proangiogenetische Mediatoren, wie auch weitere Zytokine und Integrine, die den RASF den Übertritt in das Gefäßsystem ermöglichen. Diese Hypothese bedarf jedoch weiterer detaillierter Untersuchungen. Die Erforschung der für die Migration verantwortlichen Faktoren würde zum besseren Verständnis der Ausbreitung der rheumatoiden Arthritis im Patienten beitragen. Diese Forschung könnte Hinweise geben, die zur Ausbreitung der RA über RASF führen und welche therapeutische Interventionen dem Migrationspotential der RASF entgegenwirken können.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der SCID-Maus-Experimente zum Migrationspotential von synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden neben dem implantierten humanen Knorpel auch verschiedene Organe sowie Blut der Versuchstiere entnommen. Die Auswertung dieser Proben war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Ziel der Arbeit war, den Weg der Migration von RASF durch den murinen Organismus zu analysieren. Insgesamt wurden mit Hilfe des SCID-Maus-Modells folgende Fragestellungen bearbeitet bzw. lassen sich folgende Aussagen treffen:

1. Die Ergebnisse der mittels Immunhistochemie untersuchten Organe und Blutproben unterstützen die Hypothese einer gezielten Migration der humanen RASF über das Blutgefäßsystem. Hinweise für eine ungezielte Migration und generalisierte Verteilung der RASF nach der Applikation konnten nicht gefunden.
2. Insbesondere die Detektion von RASF in immunzytochemisch gefärbten Blutproben von Versuchstieren, denen die RASF mittels unterschiedlicher (intravenös, subkutan, intraperitoneal) Applikationswege zugeführt worden waren, weisen auf eine Fibroblastenmigration über den Blutkreislauf hin. Diesen Funden muss eine Migration der RASF vom Ort der Applikation mit Übertritt in das Kreislaufsystem des Versuchstieres zugrunde liegen.
3. Der Nachweis humaner RASF in murinem Gewebe des Ohrknorpels legt die Vermutung einer Kreuzreaktion der humanen Zellen mit dem Knorpelgewebe des Versuchstieres, also Adhäsion an spezieisfremdes Gewebe, nahe.
4. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass intakte Gelenke durch die räumliche Trennung vor der Invasion durch RASF geschützt werden, da in nur einem Tier humane Zellen im murinen, intakten Gelenk nachgewiesen wurden. Mikroläsionen oder die Migration durch die verschiedenen natürlichen Barrieren des Gelenkes verlangsamten die Invasion von RASF in das intakte Gelenk, was möglicherweise in den wenigen Funden von RASF 60 Tage nach Appli-

kation resultierte. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der Beobachtung der Progression der RA, die sich über Jahre hinziehen kann.

Die Ergebnisse konnten die Fragestellung zur Aufklärung des Migrationsweges von humanen RASF über das Blutgefäßsystem beantworten.

In künftigen Experimenten gilt es, die in dieser Arbeit beschriebenen Migrationswege bezüglich der Faktoren zu untersuchen, welche für die Migration, Adhäsion und Invasion der RASF an humanem Knorpel verantwortlich sind. Nach der Feststellung des Migrationsweges sind vor allem die Ursachen von Interesse, die migrierende RASF an bestimmte Gewebe und Matrixstrukturen adhärieren und invadieren lassen und andere nicht. Ein weiterer interessanter Aspekt der Wanderung der RASF ist die bisher unbekannte Transmigration der RASF in das und aus dem Blutgefäßsystem heraus, die im SCID-Maus-Modell erstmals für RASF beschrieben wird. Ein besseres Verständnis der Interaktion von RASF mit den verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers würde neue Perspektiven einer gezielteren therapeutischen Beeinflussung der Ausbreitung der RA beim Menschen eröffnen. Damit wäre ein weiterer wichtiger Schritt auf dem Wege der Verbesserung der Situation an RA leidender Patienten getan.

VII SUMMARY

In the context of the SCID-Mouse-Experiments investigating the migratory potential of rheumatoid synovial fibroblasts (RASf) of patients with Rheumatoid Arthritis (RA), implanted human cartilage as well as several organs and blood samples from the laboratory animals were collected.

Subject of this study was the analysis of these samples. The aim was to further examine the way of transmigration of the RASf through the laboratory animals.

Altogether, by means of the SCID-Mouse-Model, the following conclusions can be drawn:

1. The results, gained from the immunohistochemical examination of organs and blood-samples support the hypothesis of a directed migration of activated RASf via the vasculature. Evidence for unsighted or unspecific spread could not be found.
2. In particular, the detection of RASf in immunocytoologically stained blood-samples taken from the SCID-Mice suggests a migration of the RASf through the vascular system. This migration seems to be independent from the way of application (intravenously, subcutaneously, intraperitoneal). These detections can only be explained by a transmigration of the RASf from the site of application to the circulatory system of the laboratory animal.
3. The detection of human RASf in murine ear cartilage leads to the assumption of a cross reaction between the human cells and the murine cartilage, implying species cross-adhesion to mouse tissue.
4. Furthermore, regarding the fact that only in one animal human cells could be found in an intact murine joint, the results indicate a protection of unspoiled joints from RASf invasion by physical separation. Microlesions or the migration through the different natural barriers of the joint could slow down the invasion of RASf into the intact joint, possibly leading to the few detections of RASf 60 days after application. These findings coincide with the idea of RA as an over years progressing disease.

The results corroborated the hypothesis of a migration of human RASF via the vascular system.

In future experiments it will be necessary to further investigate the ways of migration, examining the factors responsible for migration, adhesion and invasion of RASF into the human cartilage. After the identification of the migration-pathway it will be of primary interest to identify the causes leading to the adhesion to and invasion into specific tissues and matrix structures, while disregarding others. Another interesting aspect of the spreading of RASF is the up to now unknown transmigration in and out of the circulatory system, described for RASF in the SCID-Mouse-Model for the first time.

A better understanding of the interactions between human RASF and the different tissues of the human body could open up new perspectives on a more selective therapeutic intervention inhibiting the spreading of RA in human joints. This would be an important step towards improving the situation of patients suffering from RA.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA: *Incidence and prevalence of Rheumatoid arthritis, based on the 1987 American college of rheumatology criteria: a systematic review*. Semin Arthritis Rheum. 2006 Dec; 36(3):182-8.

Ansar Ahmed S, Dauphinee MJ, Talal N: *Effects of short-term administration of sex hormones on normal and autoimmune mice*. J Immunol 1985; 134:204.

Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. *The basic science of wound healing*. Plast. Reconstr. Surg. 2006 Jun; 117(7 Suppl): 12-34.

Edwards J: *Fibroblast biology. Development and differentiation of synovial fibroblast in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res 2000, 2:344-347.

Edworthy SM: *Morning stiffness: Sharpening an old saw*. J Rheumatol 1999; 26:1015.

Ermann J, Fathmann CG: *Autoimmune disease: genes, bugs and failes regulation*. Nat Immunol 2001;2:759-61.

Feldmann M, Brennan FM, Maini RN: *Role of Cytokines on Rheumatoid Arthritis*. Annu. Rev. Immunol. 1996. 14:397-440.

Firestein GS: *Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors?* Arthritis Rheum 1996, 39:1781-1790.

Fleming A, Crown JM, Corbett M: *Early rheumatoid disease. I. Onset. II. Patterns of joint involvement*. Ann Rheum Dis 1976; 35:357.

Franz JK, Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Burmester GR, Gay S: *T-Cell independent joint destruction*. In T-Cells in arthritis. Edited by Miossec P, van-den BW, Firestein GS. Basel: Birkenhäuser 1998:55-74.

Frey D, Hasler P, Tyndall A: *Management of rheumatoid arthritis*. Swiss Medical Weekly 1997;127:1887–1900.

Gartlehner G, Hansen RA, Jonas BL, Thieda P, Lohr KN: *The comparative efficacy and safety of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis*. J Rheumatol. 2006 Dec; 33(12):2398-408.

Gay S, Gay RE, Koopmann WJ: *Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction?* Ann Rheum Dis 1993, 52 (suppl1):39-47.

Gross WL: *Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Innere Medizin*, Classen, Diehl, Kochsiek, Elsevier Verlag, 2004, 1049-1108.

Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser V, Hinsbergh VW, Helaakoski T, Kainulainen T, Rönkä H, Tschesche H and Salo T: *Matrix-Metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells*. J Biol Chem, 1997.

Harris ED, Schur PH [A]: *Pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Uptodate online 01/2006.

Harris ED [B], Schur PH: *Risk factors for and possible causes of rheumatoid arthritis*. Uptodate online 01/2006.

Huber LC., Distler O, Tarner I, Gay R.E, Gay S and Pap T: *Synovial fibroblasts; key players in rheumatoid arthritis*. Rheumatology 2006; 45:669-675.

Ishikawa H, Hirata S, Andoh Y, Kubo H, Nakagawa N, Nishibayashi Y, Mizuno K: *Animmunohistochemical and immunoelectron microscopic study of adhesion molecules in synovial pannus formation in rheumatoid arthritis*. Rheumatol Int. 1996;16(2):53-60.

Jacoby RK, Jayson MIV, Cosh JA: *Onset, early stages and prognosis of rheumatoid arthritis: A clinical study of 100 patients with 11 year follow-up*. Br Med J 1973; 2:96.

Janossy G, Panayai G, Duke O, Bofill M, Poulter LW, and Goldstein G (1981): *Rheumatoid Arthritis: a disease of T-Lymphocyte/macrophage immunoregulation*. The lancet 839-841.

Jones G, Halbert J, Crotty M, Shanahan EM, Batterham M, Ahern M: *The effect of treatment on radiological progression in rheumatoid arthritis: a systematic review of randomized placebo-controlled trials*. Rheumatology (Oxford) 2003; 42:6–13.

Judex M, Neumann E, Fleck M, Pap T, Mountz JD, Gay RE, Schölmerich J, Nishioka K, Gay S, Müller-Ladner U: *"Inverse wrap": an improved implantation technique for virus-transduced synovial fibroblasts in the SCID mouse model for rheumatoid arthritis*. Mod Rheumatol (2001) 11:145-150.

Kahler CM, Bellmann R, Reinisch N, Schratzberger P, Gruber B, Wiedermann CJ: *Stimulation of human skin fibroblast migration by the neuropeptide secretoneurin*. Eur J Pharmacol. 1996 May 23; 304(1-3):135-9.

Kiely W, Johnson DM: *Infliximab and leflunomide combination therapy in rheumatoid arthritis: an open-label study*. Rheumatology 2002; 41: 631-637.

Kontoyiannis D, Kollias G: *Fibroblast biology. Synovial Fibroblasts in rheumatoid Arthritis: leading role or chorus line?* Arthritis Res 2000, 2:342-343

Kotzin BL, Kappler J: *Targeting the T-cell receptor in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum 1998; 41:1906.

Landewé RB, Boers M, Verhoeven AC, Westhovens R, van de Laar MA, Markusse HM, van Denderen JC, Westedt ML, Peeters AJ, Dijkmans BA, Jacobs P, Boonen A,

van der Heijde DM, van der Linden S: *COBRA combination therapy in patients with early rheumatoid arthritis: long-term structural benefits of a brief intervention*. Arthritis Rheum. 2002 Feb;46(2):347-56.

Lee DM, Weinblatt ME: *Rheumatoid arthritis*. Lancet 2001; 358:903.

Lehtinen JT, Kaarela K, Belt EA, Kautiainen HJ, Kauppi MJ, Lehto MU: *Incidence of acromioclavicular joint involvement in rheumatoid arthritis: A 15 year endpoint study*. J Rheumatol 1999; 26:1239.

Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnäcker E, Tarner I, Robbins PD, Evans CH, Stürz H, Steinmeyer J, Gay S, Schölmerich J, Pap T, Ulf Müller-Ladner U, Neumann E: *Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints*. Nature Medicine 15, 1414 - 1420 (2009).

Lineker S, Badley E, Charles C, Hart L, Streiner D: *Defining morning stiffness in rheumatoid arthritis*. J Rheumatol 1999; 26:1052.

Lipsky PE, Davis LS: *The central involvement of T-cells in rheumatoid arthritis*. The Immunologist 1998; 6:121.

Leeb SN, Vogl D, Grossmann J, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, Gelbmann CM. *Autocrine fibronectin-induced migration of human colonic fibroblasts*. Am J Gastroenterol. 2004 Feb;99(2):335-40.

Mäkinen H, Kautiainen H, Hannonen P, Möttönen T, Leirisalo-Repo M, Laasonen L, Korpela M, Blåfield H, Hakola M, Sokka T: *Sustained remission and reduced radiographic progression with combination disease modifying antirheumatic drugs in early rheumatoid arthritis*. J Rheumatol. 2007 Feb;34(2):316-21.

Marrack P, Kappler J, Kotzin BL: *Autoimmune disease: why and where it occurs*. Nat med 2001; 7:899-905.

Matucci-Cerinic M, Seferovi PM: *Heart involvement in autoimmune rheumatic diseases: the "phantom of the opera"*. Rheumatology 2006 45(Supplement 4):iv1-iv3.

Morel JC, Park CC, Zhu K, Kumar P, Ruth JH, Koch AE. *Signal transduction pathways involved in rheumatoid arthritis synovial fibroblast interleukin-18-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression*. J Biol Chem. 2002 Sep 20;277(38):34679-91. Epub 2002 Jul 8.

Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE and S: *Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal cartilage when engrafted into SCID mice*. Am J Pathol 1996; 149:1607-15.

Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler C, Pap T: *Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts*. Arthritis Res Ther. 2007; 9(6):223 [A].

Müller-Ladner U, Elices MJ, Kriegsmann JB, Strahl D, Gay RE, Firestein GS, Gay S: *Alternatively spliced CS-1 fibronectin isoform and its receptor VLA-4 in rheumatoid arthritis synovium*. J Rheumatol. 1997 Oct; 24(10):1873-80.

Müller-Ladner U [A], Pap T: *Pathogenesis of RA: more than just immune cells*. Z Rheumatol. 2005 Sep; 64(6):396-401.

Müller-Ladner U [B], Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S: *Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis*. Nat Clin Pract Rheumatol. 2005 Dec; 1(2):102-10. Review.

Neumann E , Tarner IH, Distler O, Pap T, Schedel J, Gay RE, Hashimoto A, Gay S, Müller-Ladner U: *Migration of synovial fibroblasts in the SCID mouse model for RA*. Arthritis Rheum 2005 (Suppl): S260, 632.

Neumann E [A], Tarner IH, Distler O, Robbins PD, Grifka J, Gay RE, Evans CH, Schölmerich J, Gay S, Müller-Ladner U: *Migration Capability of RA synovial fibroblasts in the SCID mouse model for RA*. Ann Rheum Dis (Suppl III), S105, 2004).

Neumann E, Judex M, Kullmann F, Grifka J, Robbins PD, Pap T, Gay RE, Evans CH, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U: *Inhibition of cartilage destruction by double gene transfer of IL-1Ra and IL-10 involves the activin pathway*. Gene Ther. 2002 Nov; 9(22):1508-19.

Neumann E [B], Tarner IH, Schedel J, Distler O, Pap T, Robbins PD, Grifka J, Gay RE, Evans CH, Schölmerich J, *Rheumatoid synovial fibroblasts (RASf) coimplanted with normal human cartilage exert destructive effects on cartilage implanted without cells at distant sites in the SCID mouse model for RA* Gay S, Müller-Ladner U:. Arthritis Rheum 50, S456, 2004.

Oppenheimer-Marks N, Davis LS, Bogue DT, Ramberg J, Lipsky PE. *Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T-lymphocytes*. J Immunol. 1991 Nov 1; 147(9):2913-21.

Ozminkowski RJ, Burton WN, Goetzel RZ, Maclean R, Wang S: *The Impact of rheumatoid arthritis on medical expenditures, absenteeism, and short-term disability benefits*. J Occup Environ Med. 2006 Feb; 48(2):135-48.

Panush RS, Kramer N, Rosenstein ED: *Assessment and prognosis of rheumatoid Arthritis*. Curr Opin Rheumatol. 1992 Jun;4(3):355-64.

Pap T, Müller-Ladner U, Gay R and S: *Fibroblast Biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Arthritis Res 2000, 2:361-367.

Pham T, Gossec L, Constantin A et al.: *Cardiovascular risk and rheumatoid arthritis: clinical practice guidelines based on published evidence and expert opinion*. Joint Bone Spine Mar 29, 2006.

Pierer M, Müller-Ladner U, Pap T, Neidhart M, Gay RE, Gay S: *The SCID mouse model: novel therapeutic targets-lessons from gene transfer*. Springer Semin Immunopathol. 2003 Aug; 25(1):65-78.

Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH: *Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978 Feb; 75(2):871-5.

Rinaldi N, Schwarz-Eywill M, Weis D, Leppelmann-Jansen P, Lukoschek M, Keilholz U, Barth TF: *Increased expression of integrins on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis in vitro correlates with enhanced binding to extracellular matrix-proteins*. Ann Rheum Dis. 1997 Jan; 56(1):45-51.

Rothschild BM, Turner KR, DeLuca MA: *Symmetrical erosive peripheral polyarthritis in the late Archaic period of Alabama*. Science 1988; 241:1498.

Schedel J, Wenglén C, Distler O, Müller-Ladner U, Schölmerich J, Heinegård D, Krenn V: *Differential adherence of osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to cartilage and bone matrix proteins and its implication for osteoarthritis pathogenesis*. Scand J Immunol. 2004 Nov; 60(5):514-23.

Silman AJ: *Epidemiology and Genetics of Rheumatoid Arthritis*. Arthritis Res 2002; 4(Suppl 3):S265-272.

Smith JB, Haynes MK: *Rheumatoid arthritis – a molecular understanding*. Ann intern Med 2002;138:908-22.

Specker C: *Cardiac manifestations of rheumatoid diseases*. Med Klin (Munich). 2006 22; 101 supply 1:140-3.

Spector TD: *Rheumatoid arthritis*: Rheum Dis Clin North Am 1990; 16:513.

Symmons D: *Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset persistence and outcome*. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2002 Dec; 16(5):707-22.

Szekanecz Z, Koch AE: *Mechanisms of Disease: angiogenesis in inflammatory diseases*. Nat Clin Pract Rheumatol. 2007 Nov; 3(11):635-43.

Takagi H, Ishiguro N, Iwata H, Kanamono T: *Genetic association between rheumatoid arthritis and estrogen receptor microsatellite polymorphism*. J Rheumatol 2000; 27:1638.

Turner IH, Müller-Ladner U, Gay RE, Fathman CG, Gay S: *The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis – Gene Transfer to Detect Novel Targets for Treatment*. Frontiers in Autoimmunity 2003; IOS Press, Amsterdam:315-346.

Toivanen P: *Mikrobes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. In Firestein, Panayi, Wollheim, Rheumatoid Arthritis, 2nd Edition, Oxford University Press, 2006:250-252.

Van den Berg, WB: Joint *inflammation and cartilage destruction may occur uncoupled*: Springer Semin Immunopathol. 1998; 20(1-2):149-64.

Van Jaarsveld CH, Jacobs JW, van der Veen MJ, Blaauw AA, Kruize AA, Hofman DM, Brus HL, van Albada-Kuipers GA, Heurkens AH, ter Borg EJ, Haanen HC, van Booma-Frankfort C, Schenk Y, Bijlsma JW: *Aggressive treatment in early rheumatoid arthritis: a randomised controlled trial. On behalf of the Rheumatic Research Foundation Utrecht, The Netherlands*. Ann Rheum Dis 2000; 59:468–477.

White ES, Thannickal VJ, Carskadon SL, Dickie EG, Livant DL, Markwart S, Toews GB, Arenberg DA: *Integrin alpha4beta1 regulates migration across basement membranes by lung fibroblasts: a role for phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*. Am J Respir Crit Care Med. 2003 Aug 15; 168(4):436-42. Epub 2003 Jun 5.

Ziff M: *Rheumatoid Arthritis – Its present and future*. J. Rheumatol. 2000;17, 127-133.

Zimmermann B, Lefevre S, Fischer S, Gansler J, Frommer KW, Stürz H, Steinmeyer J, Müller-Ladner U, Neumann E: *Transmigration and invasion are early events in cartilage destruction in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum 68, S380, 2009

Zinkernagel RM: *Maternal antibodies, childhood infections, and autoimmunediseases*. N Engl. J Med 2001; 345:1331. Zwaifler NJ: *Clinical aspects of rheumatoid arthritis*. In Firestein, Panayi, Wollheim, Rheumatoid Arthritis, 2nd Edition, Oxford University Press, 2006:250-252.