

# **Migrationspotential synovialer Fibroblasten bei der rheumatoiden Arthritis**

**Dissertation**

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) des  
Fachbereichs Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Dipl. Biol. Stephanie Lefèvre  
geboren am 04.10.1979 in Braunfels

Gießen/Bad Nauheim 2010



Diese Arbeit wurde am Institut für Rheumatologie und klinische Immunologie des Lehrstuhls für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Martin

Lehrstuhl für Immunologie des Fachbereichs Biologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulf Müller-Ladner

Lehrstuhl für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie des  
Fachbereichs Medizin  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation: 31.03.2010



# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Rheumatoide Arthritis	1
1.1.1	Kriterien zur Diagnose der rheumatoiden Arthritis	4
1.2	Das Gelenk	5
1.2.1	Gelenkknorpel	6
1.2.2	Synovium	7
1.3	Pathophysiologie der Gelenkzerstörung in der rheumatoiden Arthritis	8
1.3.1	Synoviale Veränderungen im Verlauf der rheumatoiden Arthritis	8
1.3.1.1	<i>Synoviale Hyperplasie</i>	9
1.3.1.2	<i>Neoangiogenese</i>	10
1.3.1.3	<i>Adhäsionsmoleküle</i>	11
1.3.1.4	<i>Zelluläre Migration</i>	13
1.4	Der synoviale Fibroblast in der rheumatoiden Arthritis	14
1.4.1	Rheumatoide synoviale Fibroblasten und Matrixdegradation	17
1.5	SCID-Mausmodell	18
1.6	Fragestellung	21
2	MATERIAL	22
2.1	Verwendete Organismen	22
2.1.1	Tiere	22
2.1.2	Adenoviren	22
2.2	Chemikalien und Materialien	23
2.3	Medien und Lösungen	25
2.4	Enzyme	25
2.5	Antikörper und Proteine	26
2.6	Molekularbiologische und immunologische Kits	27
2.7	Komponenten der extrazellulären Matrix	28
2.8	Oligonukleotide ( <i>primer</i> )	28
2.9	Geräte und Software	30
3	METHODEN	31
3.1	Zellbiologische Methoden	31
3.1.1	Gewebeentnahme	31
3.1.2	Einfrieren und Lagerung der Synovialgewebe	32
3.1.3	Isolation der synovialen Fibroblasten	32

3.1.4	Passagieren der synovialen Fibroblasten	33
3.1.5	Einfrieren der synovialen Fibroblasten	33
3.1.6	Auftauen der synovialen Fibroblasten	33
3.1.7	Bestimmung der Zellzahl	34
3.2	Adenovirale Transduktion synovialer Fibroblasten	34
3.3	Migrationsmodell der rheumatoiden Arthritis: SCID-Mausmodell	35
3.3.1	<i>Inverse wrap</i> -Implantationstechnik in SCID-Mäuse	35
3.3.2	Injektion der rheumatoiden synovialen Fibroblasten	38
3.3.3	Zeitversetzter Implantattransfer	40
3.3.4	Kollagenase-Injektion	41
3.3.5	Injektion der Antikörper gegen VCAM-1 und TNF $\alpha$	41
3.3.6	Effekt einzelner Matrixbestandteile auf die Migration	42
3.3.7	Entnahme der Implantate, Organe, Gelenke und des Blutes	42
3.4	Histologische und immunologische Methoden	43
3.4.1	Anfertigung von Gefrierschnitten	43
3.4.2	Dekalzifizierung und Anfertigung von Paraffinschnitten	44
3.4.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	44
3.4.4	Giemsa-Färbung	45
3.4.5	Histologische Auswertung der Implantate und Organe	45
3.4.6	Immunhistochemie	46
3.4.7	Zytospin und Immunzytochemie	47
3.4.8	Nachweis humaner Zellen im murinen Blut mittels FACS-Analyse	47
3.4.9	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	48
3.5	Molekularbiologische Methoden	48
3.5.1	RNA-Isolation	48
3.5.2	Reverse Transkription (RT)	49
3.5.3	Differenzierung muriner und humaner Zellen mittels PCR	50
3.5.4	Agarose-Gelelektrophorese	50
3.5.5	<i>real time</i> -PCR	51
3.5.6	Laser-medierte Mikrodissektion	53
3.6	Methoden zur zellulären Migration	54
3.6.1	Chemotaktische Analyse in der Boyden-Kammer	54
3.6.2	<i>Scrape motility assay</i>	57
3.7	Statistische Auswertung	57

4	ERGEBNISSE	58
4.1	Migrationspotential der rheumatoiden synovialen Fibroblasten	58
4.1.1	Analyse des Migrationspotentials	58
4.1.2	Nachweis des humanen Ursprungs der invadierenden Zellen	62
4.1.3	Zeitversetzte Implantation	63
4.1.4	Injektion der rheumatoiden synovialen Fibroblasten	64
4.1.5	Implantattransfer nach 14 Tagen	66
4.1.6	Migration aus humanem Synovium	68
4.2	Einfluss des Knorpels	69
4.2.1	Einfluss der Chondrozyten auf die Migration	69
4.2.2	Implantation speziesfremden Knorpels	71
4.2.3	Analyse des murinen Ohrknorpels und der intakten Gelenke	72
4.3	Weg der Migration	75
4.3.1	Analyse muriner Organe	75
4.3.2	Synoviale Fibroblasten im murinen Blut	76
4.3.3	Zeitpunkt der Angiogenese	79
4.4	Rolle der Knorpelmatrix	80
4.4.1	Analyse des chemotaktischen Potentials der Knorpelmatrix	80
4.4.2	Analyse definierter Bestandteile der Knorpelmatrix <i>in vivo</i>	81
4.5	Adhäsionsmoleküle an der Invasionszone	83
4.6	Therapeutische Ansätze zur Analyse und Inhibition der Migration	84
4.6.1	Analyse der ungerichteten Migration	84
4.6.2	Chemotaktische Effekte auf rheumatoide synoviale Fibroblasten	85
4.6.3	Inhibition der Adhäsion und Transmigration <i>in vivo</i>	86
4.7	Wiedererlangung der T- und B-Zellaktivität der SCID-Mäuse	87
5	DISKUSSION	88
5.1	Das Migrationspotential	88
5.2	Wundheilung und Angiogenese	91
5.3	Weg der Migration	92
5.4	Gesunder muriner Gelenk- und Ohrknorpel	95
5.5	Einfluß der Chondrozyten und der extrazellulären Matrix	96
5.6	Chemotaktische Effekte der Knorpelmatrix	99
5.7	Experimentelle therapeutische Interventionen	100
5.8	Potentielle therapeutische Ziele	102
5.9	Subpopulationen	103

6	ZUSAMMENFASSUNG	105
7	LITERATUR	107
8	ANHANG	119
8.1	Abkürzungsverzeichnis	119
8.2	Wissenschaftliche Publikationen	122

# 1 EINLEITUNG

Die rheumatoide Arthritis (RA; chronische Polyarthritis) ist eine chronisch verlaufende, entzündlich-systemische Autoimmunerkrankung, die primär Gelenke betrifft und durch deren progressive Destruktion charakterisiert ist. Sie beginnt meist in einzelnen kleinen Gelenken, schreitet jedoch in ihrem Verlauf oftmals symmetrisch voran. Die Gelenke der Hand und Kniegelenke sind dabei am häufigsten betroffen. Die RA gehört zusammen mit den Kollagenosen (u.a. Sklerodermie, Lupus erythematodes, Sjögren-Syndrom), den Vaskulitiden (z. B. Morbus Wegener), der Spondylitis ankylosans (Morbus Bechterew), der Psoriasis-Arthritis und anderen Erkrankungen mit entzündlichen Veränderungen des Bindegewebes zum rheumatischen Formenkreis.

## 1.1 Rheumatoide Arthritis

Die RA stellt mit einer Prävalenz von etwa 1% in der europäischen Bevölkerung die am häufigsten vorkommende Form der entzündlichen Arthritis dar. Wie die meisten zum rheumatischen Formenkreis gehörenden Erkrankungen kann die RA in ihrem Verlauf den gesamten menschlichen Organismus betreffen (Young A und Koduri G, 2007). Sie kann in jedem Alter einsetzen, jedoch ist eine besondere Häufung zwischen dem 35. und 45. Lebensjahr mit steigender Inzidenz bei zunehmendem Alter zu beobachten. Frauen sind zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Männer. Der Fortschritt der RA kann heute durch moderne Therapien teilweise aufgehalten werden, was hohe Behandlungskosten und, je nach Therapie, starke Nebenwirkungen zur Folge haben kann. Die Erkrankung ist bisher nicht heilbar und führt unbehandelt zu erheblichen Einschränkungen in der Lebensqualität sowie in der Berufsausübung bis hin zur Invalidität.

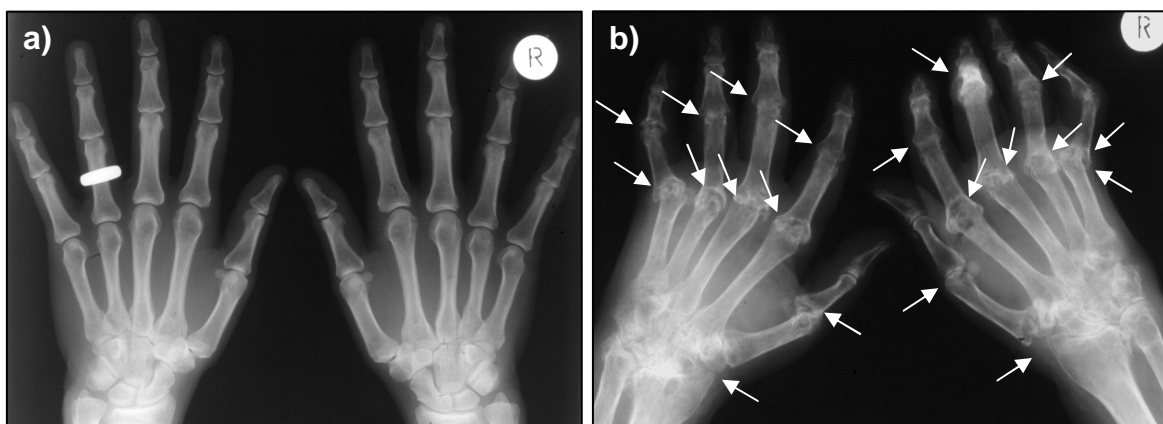
Trotz erheblicher Bemühungen der letzten Jahre konnten die Auslöser der Erkrankung und die detaillierte Pathogenese auch mit Hilfe moderner molekularbiologischer Methoden und unter Verwendung von Tiermodellen nur unvollständig geklärt werden (Choy EH und Panayi GS, 2001; Feldmann M, 2001; el-Gabalawy H, 2009). Umwelt- und genetische Faktoren scheinen eine Rolle bei der Entstehung der RA zu spielen. Das invasive Wachstum des für die RA

charakteristischen hyperplastischen, gefäßreichen und entzündlich-reaktiven Synoviums (Pannus) über und in den Knorpel und den Knochen führt im Verlauf der Erkrankung zur Destruktion dieser Gewebe. Die im Synovium lokalisierten Fibroblasten und Makrophagen sezernieren Zytokine und andere proinflammatorische Mediatoren, die zur Rekrutierung und Anreicherung weiterer Entzündungszellen (u. a. Lymphozyten) im Synovium und der Synovialflüssigkeit führen. Die Synovialflüssigkeit von RA-Patienten weist eine vermehrte Anzahl an Neutrophilen, Granulozyten und Makrophagen sowie eine verminderte Viskosität auf (Fassbender HG, 1983; Zvaifler NJ et al., 1994). Autoimmune und entzündliche Prozesse sowie ein komplexes Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen tragen zur Entwicklung und Aufrechterhaltung der RA bei (Arai KI et al., 1990; Ermann J und Fathman G, 2001). Änderungen in der Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle, Proteinase, Proteinase-Inhibitoren sowie zahlreicher Zytokine sind weitere Merkmale der synovialen Zellen (Lee DM und Weinblatt ME, 2001). Bislang nicht ausreichend identifizierte Faktoren führen zur Aktivierung und zunehmenden Vaskularisierung des Synoviums. Durch den fortschreitenden Entzündungsprozess können inflammatorische Abläufe durch inhibitorische Mediatoren und Mechanismen nicht mehr ausgeglichen werden. Der mittlerweile T-Zell-dominierte Prozess ist irreversibel und führt zu akuten entzündlichen Schüben. Eine starke Verdickung und Einschränkung der Mobilität der Gelenke ist die Folge. Letztendlich resultiert dieser Verlauf in einer Progression der Gelenkdestruktion (Abb. 1, 2).



**Abb. 1:** Typisches Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis. Zunächst sind kleinere Gelenke, wie Finger- oder Zehengelenke, betroffen. Der progressive Verlauf der Erkrankung kann durch die Zerstörung der Gelenke bis zu deren Immobilität führen. Bildquelle: Abt. Rheumatologie; Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim

Die RA stellt sich vielfältig dar. Der Ausbruch der Erkrankung wird oftmals nicht sofort erkannt, da eine Abgrenzung zu anderen Gelenkerkrankungen zunächst erschwert ist. Mehrere Monate können vergehen, bis eine endgültige, eindeutige Diagnose gestellt wird. Dominierende Symptome sind Schmerz, Steifigkeit und Schwellung der peripheren Gelenke. Die Zerstörung der Gelenke infolge der ausgeprägten Synovitis kann bereits im frühen Stadium der Erkrankung erfolgen und ist bei 70% der Patienten in den ersten zwei Jahren feststellbar. Der klinische Verlauf variiert stark von einer leichten, selbstlimitierenden Arthritis bis hin zur schnell fortschreitenden, mehrere Gelenke betreffenden Arthritis (Abb. 1, 2) mit steigender Morbidität und Mortalität (Lee DM und Weinblatt ME, 2001).



**Abb. 2:** Radiologischer Verlauf der rheumatoiden Arthritis. In a) sind die Hände einer Patientin zu Beginn der Erkrankung dargestellt. b) zeigt die Hände derselben Patientin nach etwa 10 Jahren. Die fortschreitenden Destruktionen und Deformationen nahezu aller Finger- und Handgelenke sind in b) deutlich zu erkennen. Der Gelenkspalt sowie scharfe Abgrenzungen einzelner Gelenke sind oftmals aufgrund der massiven Zerstörung nicht mehr erkennbar (weiße Pfeile). Bildquelle: Abt. Rheumatologie; Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim

Abzugrenzen ist die RA von der Osteoarthritis (OA, *Arthrosis deformans*). Hierbei handelt es sich um eine fortschreitende, degenerative Erkrankung der Gelenke, die insbesondere den Gelenkknorpel betrifft („Gelenkverschleiß“). Ursachen für eine OA sind beispielsweise ein Übermaß an Belastung durch erhöhtes Körpergewicht oder Fehlstellungen der Gelenke. Weitere Ursachen sind angeborene Gelenkdysplasien, traumatisch bedingte Ursachen, knöcherne Deformationen durch z. B. Osteoporose, fehlerhafte Zusammensetzung der Knorpelmatrix oder genetische Faktoren. Jedes Gelenk kann von der OA betroffen sein. Im Unterschied zur RA verläuft die OA nicht symmetrisch oder systemisch. Des Weiteren sind Entzündungen der beteiligten Gelenke sekundär, im Vergleich zur RA relativ schwach ausgeprägt und nicht

chronisch. Mit zunehmender Erkrankungsdauer erodiert der Knorpel. Er verliert an Festigkeit sowie Elastizität und es kommt zum Verlust seiner biomechanischen Fähigkeiten. Belastungen können nicht mehr effektiv verteilt werden und ein glattes Gleiten der Gelenkflächen gegeneinander wird unmöglich. Im Verlauf der OA kann nicht nur der Knorpel, sondern auch der darunterliegende Knochen, der Bandapparat, die Synovialmembran und die gelenkumgreifende Muskulatur betroffen sein. Starke Schmerzen und der Verlust der Beweglichkeit durch zunehmende Knorpelschädigung und Deformation des Gelenks, z. B. durch Ausbildung von Osteophyten, sind die Folge (Shlopov BV et al., 1997; Goldring SR und Goldring MB, 2006; Goldring MB und Goldring SR, 2007). Sekundär kann eine OA aus einer RA oder durch eine sekundäre Ergußreaktion (aktivierte Arthrose) hervorgehen. Da sich die primären Symptome von RA und OA oftmals gleichen, können Laboruntersuchen diagnostische Klarheit bringen. Bei der RA sind die unspezifischen Entzündungswerte wie die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) oder die Menge an C-reaktivem Protein (CRP) stark erhöht. Darüber hinaus sind neben der Bestimmung des Rheumafaktors (Rf) sowie von Autoantikörpern gegen citrullinierte Proteine noch weitere Parameter zur Abgrenzung von anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises hilfreich (Hartung K und Seelig HP, 2007). Erst durch zusätzliche Laborwerte, weitere Untersuchungen und deren anschließende kombinierte Auswertung können eine eindeutige Diagnose gestellt und andere Erkrankungen ausgeschlossen werden.

### **1.1.1 Kriterien zur Diagnose der rheumatoiden Arthritis**

Die Diagnose der RA erfolgt mit Hilfe klinischer Tests wie dem Gehtest, der Bestimmung der Griffstärke, labormedizinischer Untersuchungen mit Bestimmung des CRPs, der BSG, des Rfs, von Antikörpern gegen zyklisch citrullinierte Peptide sowie bildgebenden Verfahren wie der Magnetresonanz- und Computertomographie (Panush RS et al., 1992).

Die Klassifizierung der Erkrankung als RA kann mit Hilfe der 1987 revidierten Kriterien des *American College of Rheumatology* erfolgen (Tab. 1) (Arnett FC et al., 1988). Vier der sieben Kriterien müssen zur Klassifizierung erfüllt sein, wobei die Kriterien 1.-4. länger als sechs Wochen bestehen müssen.

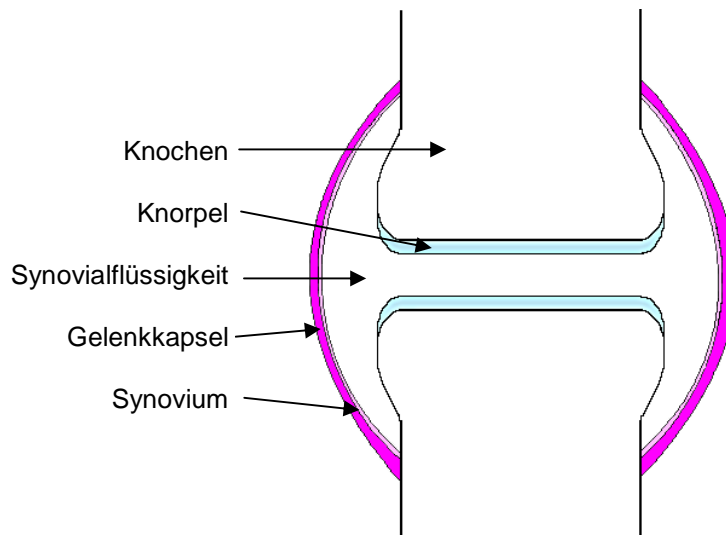
**Tab. 1:** Kriterien des *American College of Rheumatology* zur Klassifizierung der RA

	Kriterium
1.	Morgensteifigkeit in den Gelenken oder um die Gelenke von mind. 1 h Dauer bis zur maximalen Besserung
2.	Arthritis von mind. 3 Gelenkregionen; Weichteilschwellung/Erguss in mind. 3 der folgenden 14 Gelenkregionen: PIP-, MCP-, Hand-, Ellbogen-, Knie-, Sprung-, MTP-Gelenke
3.	Arthritis der Hände; Befall von mind. einem Hand-, MCP od. PIP-Gelenk
4.	Symmetrische Arthritis; gleichzeitiger Befall derselben Gelenkregion auf beiden Seiten
5.	Subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen oder gelenknahen Streckseiten
6.	Rheumafaktornachweis im Serum
7.	Radiologische Veränderungen; (Erosionen, gelenknahe Osteoporose) in Hand und Handgelenk (arthrotische Veränderungen sind nicht zu werten)

MCP = metacarpophalangeal, PIP = proximal interphalangeal, MTP = metatarsophalangeal

## 1.2 Das Gelenk

Ein echtes Gelenk besteht aus zwei oder mehreren Knochen, deren Enden mit hyalinem Knorpel überzogen sind, der aus dem Periost hervorgehenden, das Gelenk umgebenden Gelenkkapsel mit innenliegendem Synovium und den Gelenkbändern. Das Synovium bzw. die synovialen ortsständigen Zellen, hauptsächlich die sogenannten Typ-A-(makrophagenartige) und Typ-B-(fibroblastenartige) Synoviozyten, produzieren die im Gelenkspalt befindliche viskose Synovialflüssigkeit, die das Gleiten der Gelenkoberflächen und damit die Beweglichkeit des Gelenks ermöglicht (Smith MD et al., 2003) (Abb. 3). Die zweischichtige Gelenkkapsel enthält freie Nervenendigungen und Gefäße. In einige Gelenke, wie beispielsweise dem Knie, sind inkongruente Gelenkflächen ausgleichende und puffernde faserknorpelige Zwischenscheiben (Disci oder Menisci) eingelagert. Gelenke besitzen insgesamt einen geringen Anteil an Gefäßen. Die Versorgung des Knorpels erfolgt hauptsächlich durch Diffusion von Nährstoffen in der Synovialflüssigkeit (Wong M und Carter DR, 2003; Neu CP et al., 2008).



**Abb. 3** : Schematische Darstellung eines gesunden humanen Gelenks. Die Gelenkbänder sowie Menisci/Disci sind nicht eingezeichnet.

### 1.2.1 Gelenkknorpel

Die glatte Oberfläche des gesunden Gelenkknorpels ermöglicht mit Hilfe der Synovialflüssigkeit ein reibungsloses Gleiten der Gelenkflächen übereinander, ohne dass sich die Oberflächen berühren. Druck sowie Scherkräfte werden auf die gesamte Fläche des subchondralen Knochens übertragen (Poole AR et al., 1993). Der hyaline Knorpel setzt sich aus einer avaskulären, alymphatischen und nicht innervierten extrazellulären Matrix (EZM) zusammen, in der die matrixbildenden Chondrozyten eingelagert sind (Muir H, 1995). Hauptbestandteile der Matrix sind Kollagene, v. a. Typ II, aber auch Typ V, IX, X und XI, Glykosaminoglykane (z. B. Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat) und Proteoglykane (z. B. Aggrekan, Fibronectin). Neben der Matrix besteht Knorpel zu 60-80% aus Wasser. Dies führt zu seinen typischen Eigenschaften und ermöglicht die Versorgung der Chondrozyten durch Diffusion. Die zelluläre Masse, die Chondrozyten, stellt einen Anteil von ca. 5% der Gesamtknorpelmasse dar (Stockwell RA, 1978; Muir H, 1995; Buckwalter JA und Mankin HJ, 1998; Eyre D, 2002).

Die Chondrozyten synthetisieren und erhalten die EZM des Knorpels. Da ein kontinuierlicher Matrixumbau im gesunden Gelenk stattfindet, sind Chondrozyten in der Lage, durch matrixdegradierende Enzyme die Knorpelmatrix ab- und umzubauen. Der Prozess des Abbaus und der Neusynthese der Matrix ist ein natürlicher Prozess und wird durch zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren im

Gleichgewicht gehalten (Abramson SB und Amin A, 2002). Umgeben sind die Chondrozyten von einer perizellulären Kapsel, die den Knorpelhof bildet und die Zelle vor mechanischen Einflüssen schützt. Diese funktionelle und strukturelle Einheit wird als Chondron bezeichnet (Poole AR et al., 1987). Adulte Chondrozyten teilen sich im gesunden ausgereiften Gelenkknorpel kaum (Trippel SB, 1990), was eine Knorpelregeneration, z. B. nach Verletzungen, fast unmöglich macht. Zusätzlich werden degenerative Prozesse durch die Gefäßarmut und hohe mechanische Belastung begünstigt.

### 1.2.2 Synovium

Im gesunden Gelenk dient das die Gelenkhöhle auskleidende Synovium dem Transport von Nährstoffen und anderen Molekülen zwischen Gelenk und umgebendem Gewebe. Weitere Aufgaben sind die Aufrechterhaltung der Gleitfähigkeit des Gelenks, z. B. durch Produktion von Hyaluronsäure, Filtration von diffundierten Molekülen, aber auch der Schutz und die Trennung der Gewebe. Die an der Gelenkkapsel anliegende Schicht des Synoviums, auch als *sublining* bezeichnet, weist eine relativ zellarme, matrixreiche Struktur sowie versorgende Blutgefäße auf. Adipozyten und v. a. Fibroblasten als auch Makrophagen liegen im *sublining* vor, sowie vereinzelte weitere Zellen wie bspw. Lymphozyten. Das *sublining* geht in die an den Gelenkspalt angrenzende synoviale Deckzellschicht (*lining layer*) über. Das physiologisch glatte *lining layer* besteht im gesunden Gelenk aus einer etwa ein- bis dreireihigen Lage synovialer Deckzellen (Synoviozyten). Hier lassen sich morphologisch zwei Zelltypen unterscheiden: 1) Makrophagen (Typ A-Synoviozyten) und 2) synoviale Fibroblasten (SF; Typ B-Synoviozyten) (Smith MD et al., 2003). SF sind für den kontinuierlichen Umbau der Matrix verantwortlich, indem sie kontrolliert matrixabbauende Enzyme (z. B. Matrix-Metalloproteinasen (MMP), Cathepsine) als auch deren Inhibitoren (TIMP; *tissue inhibitors of metalloproteinases*) sowie Matrixkomponenten wie z. B. Kollagen, Fibronectin oder Hyaluronsäure freisetzen. Dabei besteht eine Balance zwischen Abbau und Aufbau der Matrix (Mor A et al., 2005; Abeles AM und Pillinger MH, 2006). Im gesunden Gelenk liegen antiinflammatorische Zytokine (z. B. IL-1 Rezeptor-Antagonist), knochenprotektive Moleküle (z. B. Osteoprotegerin) und reduzierte Mengen an Adhäsionsmolekülen vor,

was zu einem antientzündlichen Milieu führt (Arend WP, 1993; Smith MD et al., 2003). Dadurch werden Matrix-abbauende, proentzündliche Prozesse unterdrückt.

### **1.3 Pathophysiologie der Gelenkzerstörung bei der rheumatoiden Arthritis**

Charakteristisch für die RA sind die chronische Entzündung in den Gelenken, die synoviale Hyperplasie sowie eine veränderte Immunreaktion, die im Verlauf der Erkrankung zur progressiven Destruktion der Gelenke führen (Gay S et al., 1993).

Wichtige Mediatoren des entzündlichen Prozesses sind Zytokine, die je nach ihrer Wirkungsweise hauptsächlich in pro- und antiinflammatorisch wirksame Gruppen eingeteilt werden. Zytokine sind für die Kommunikation zwischen Zellen verantwortlich. Dabei sind ihre Aufgaben vielfältig. Sie spielen eine Rolle in Wachstum, Differenzierung, Immunregulation, Chemotaxis und der Vermittlung sowie Hemmung der Entzündung. Im Krankheitsverlauf der RA sind T-Zellen, v. a. aber Fibroblasten und Makrophagen an der Sekretion der Zytokine beteiligt. Zentrale Zytokine im Zusammenhang mit der Entzündung in der RA sind Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin (IL)-1 $\beta$  und IL-6 (Maini RN et al., 1994; Arend WP, 2001). Daher wurde und wird mit Hilfe verschiedener therapeutischer Strategien versucht, die Wirkung dieser Schlüsselzytokine durch spezifische neutralisierende Antikörper oder Rezeptor-Antagonisten im von der RA betroffenen Patienten zu unterdrücken. Hierzu gehören bspw. TNF $\alpha$ -Blockade, IL-1 Rezeptor-Antagonisten oder auch Antikörper gegen B-Zellen (Bingham CO 3rd, 2008).

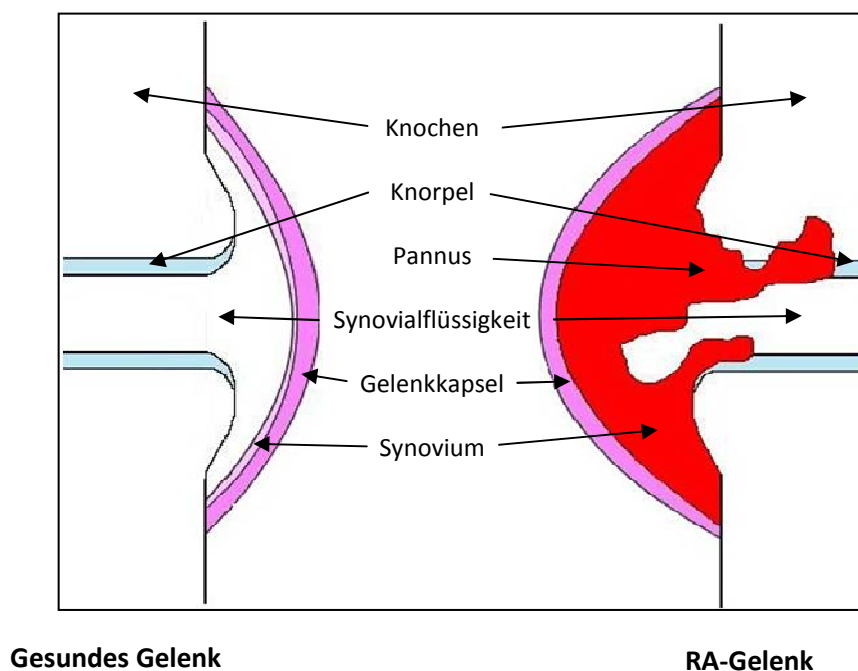
#### **1.3.1 Synoviale Veränderungen im Verlauf der rheumatoiden Arthritis**

Zentrales Merkmal der RA ist neben der chronischen Entzündung und Zellaktivierung die synoviale Hyperplasie. Folge dieser Prozesse ist die fortschreitende Destruktion des Gelenkknorpels und des Knochens.

### 1.3.1.1 Synoviale Hyperplasie

Die synoviale Hyperplasie, die auch als Pannusbildung bezeichnet wird, führt zur Einwanderung des Synoviums in den darunter liegenden Knorpel und Knochen (Pap T et al., 2000a; Müller-Ladner U et al., 2005; Karouzakis E et al., 2006). Frühe synoviale Veränderungen der RA sind die verringerte Apoptose der ortsständigen synovialen Zellen, die durch ihre längere Lebensdauer und damit verbundener Akkumulation zur Hyperplasie des *lining layers* und des *sublinings* beitragen, sowie die Einwanderung von Entzündungszellen aus dem Blutkreislauf, darunter Leukozyten, dendritische Zellen, Makrophagen, natürliche Killer-Zellen und eine verstärkte Angiogenese (Zvaifler NJ et al., 1994; Matsumoto S et al., 1996; Bodolay E et al., 2002). Im Vergleich zur gesunden Deckzellschicht ist das *lining layer* in der RA stark verdickt. Das hyperplastische Synovium überwächst und wandert in den darunterliegenden Knorpel ein (Abb. 4). Auffälligerweise beginnt die Invasion des Knorpels meist am Knorpel-Knochen-Übergang.

Weitere Besonderheiten des RA-Synoviums sind eine vermehrte Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle durch aktivierte gewebständige Zellen und eine gesteigerte Zytokin-Synthese (Youssef PP et al., 1997; Smith JB und Haynes MK, 2002).



**Abb. 4:** Vergleich des Gelenkaufbaus eines gesunden Gelenks mit einem erkrankten Gelenk. Auffällig zeigt sich das verdickte Synovium im RA-Gelenk (Pannus). Es überwächst und dringt in den darunter liegenden Knorpel und Knochen ein.

### 1.3.1.2 Neoangiogenese

Die Bildung neuer Kapillaren aus bestehenden Blutgefäßen (Angiogenese), ist bei der Wundheilung oder Tumor-Progression sowie in der RA ein wichtiges Merkmal. Die Gefäßneubildung wird im RA-Synovium durch ein Ungleichgewicht zwischen angiogenetischen Faktoren und deren Inhibitoren schon zu Beginn der Erkrankung induziert und resultiert in der Aktivierung des Endothels (Lee DM und Weinblatt ME, 2001; Fearon U et al., 2003; Szekanecz Z und Koch AE, 2007). Die Transmigration der Leukozyten in das synoviale Gewebe aus dem Gefäßsystem wird ermöglicht. Es kommt zu einer veränderten, fortdauernden Neoangiogenese (Hartlapp I et al., 2001; Szekanecz Z und Koch AE, 2007).

Die in der RA vorherrschende Hypoxie im Gelenk führt zusätzlich zur Expression proinflammatorischer Zytokine, darunter IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , proangiogenetischer Faktoren, vor allem VEGF (*vascular endothelial growth factor*), M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*), TGF $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) und bFGF (*basic fibroblast growth factor*), aber auch Matrix-degradierender Enzyme (Koch AE et al., 1994; Veale DJ und Fearon U, 2006; Akhavani MA et al., 2009). Diese Faktoren tragen zur Durchlässigkeit der Gefäße bei, indem Endothelzellen aktiviert werden. Es kommt daraufhin durch Matrixabbau zur Abwanderung, Proliferation und Migration endothelialer Zellen. Durch Neubildung der Basalmembran erfolgt die Formation neuer Kapillaren (Szekanecz Z und Koch AE, 2004; Szekanecz Z und Koch AE, 2005; Szekanecz Z und Koch AE, 2009). Die nachfolgenden Interaktionen von Angiopietin 1 mit dem Tyrosinkinase Rezeptor 2 führen zur Stabilisierung der neu entstandenen Gefäße (Davis S et al., 1996). Adhäsionsmoleküle sowie Komponenten der EZM nehmen bei der Gefäßneubildung eine wichtige Rolle ein. Sie tragen maßgeblich zur Bildung neuer Kapillaren bei (Brooks PC et al., 1994; Friedlander M et al., 1995; Koch AE, 1998). Die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle, v. a. von Integrinen, ist im Vergleich zur OA oder normalem Endothelium stark erhöht. Die proangiogenetischen Faktoren TNF $\alpha$ , bFGF, TGF $\beta$  und VEGF führen u. a. über  $\beta_1$ -Integrine, Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , E-Selektin und VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) zur Neovaskularisierung (Koch AE, 1998; Szekanecz Z et al., 2003). Auch eine gesteigerte Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten ist die Folge, wodurch der Einstrom weiterer Entzündungszellen ermöglicht wird, die zusätzliche proangiogenetische Faktoren sezernieren. Durch

Integrin-Antagonisten oder Antikörper konnte bereits die Angiogenese im Tiermodell gehemmt werden (Brooks PC et al., 1994).

### **1.3.1.3 Adhäsionsmoleküle**

Ein wichtiger Aspekt in der RA ist die Adhäsion verschiedener Zelltypen des hyperplastischen Synoviums, insbesondere der RA synovialen Fibroblasten (RASF), an die Knorpelmatrix bzw. an synoviale Zellen. Diese Interaktionen sind für das Ausmaß und den Verlauf der Erkrankung von entscheidender Bedeutung. Verschiedene Adhäsionsmoleküle sind an der Ausbildung des Pannus und der anschließenden Destruktion des Knorpels und Knochens maßgeblich beteiligt. Eine weitere Folge der Zelladhäsion ist die Induktion intrazellulärer Signaltransduktionswege (Hogg N et al., 2003; Ridley AJ et al., 2003), wodurch Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Motilität und andere Prozesse innerhalb der Zelle beeinflusst werden.

Es gibt vier Gruppen von Adhäsionsmolekülen, die im Krankheitsverlauf der RA eine wichtige Rolle spielen: Selektine, Integrine, Immunoglobuline und Cadherine (Hynes RO, 1992; Postigo AA et al., 1993; Springer TA, 1994; Petruzelli L et al., 1999; Patel KD et al., 2002; Wheelock MJ und Johnson KR, 2003; Ffrench-Constant C und Colognato H, 2004). Selektine ermöglichen u. a. die Adhäsion der Leukozyten an das Endothel, dem zentralen ersten Schritt der Infiltration von Entzündungszellen in das Gewebe. Integrine tragen zu Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen bei und sind in der Lage, intrazelluläre Signalwege zu induzieren. Immunoglobuline sind durch die Bindung an Integrine ebenfalls an der Regulation biologischer Prozesse beteiligt. Cadherine spielen neben der Adhäsion eine Rolle in der Regulation intrazellulärer Signalwege, die z. B. zur Zellproliferation oder Produktion von MMP führen (Hazan RB et al., 2000; Kim JB et al., 2000; Tran NL et al., 2002).

Adhäsionsmoleküle werden in der RA konstitutiv oder nach Induktion durch proinflammatorische Zytokine exprimiert. TNF $\alpha$  spielt hier eine wichtige Rolle (Silvermann MD et al., 2007). Für RASF am Pannus-Knorpel-Übergang konnte bereits eine erhöhte Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle nachgewiesen werden. Dazu gehören VCAM-1, ICAM-1, CD44 und verschiedene Integrine (Marlor CW et al., 1992; Morales-Ducret J et al., 1992; Kriegsmann J et al., 1995; Pirilä L und

Heino J, 1996; Müller-Ladner U et al., 1997; Rinaldi N et al., 1997; Pirilä L et al., 2001; Silverman MD et al., 2007). Durch die folgende starke Bindung der RASF an die EZM, v. a. an Kollagen II und Glukosaminglykane, wird die Invasion der RASF in den Knorpel ermöglicht. Weiterhin spielen Adhäsionsmoleküle eine zentrale Rolle bei der zellulären Adhäsion an Endothelzellen und der Transmigration von Entzündungszellen in das Synovialgewebe.

### ***Integrine in der rheumatoiden Arthritis***

Integrine stellen in der RA eine wichtige Familie der Adhäsionsmoleküle dar. Sie sind Heterodimere, die aus je einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Ihre Hauptliganden sind Proteine der EZM oder zelluläre Oberflächenproteine. Durch Integrine werden Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakte vermittelt. Dabei spielt die  $\beta_1$ -Untereinheit in Verbindung mit  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  oder  $\alpha_5$  eine zentrale Rolle (Kriegsmann J et al., 1995; Rinaldi N et al., 1997). Durch diese Integrine werden Zell-Matrix-Interaktionen, sowie, durch Bindung an Mitglieder der Immunglobulinfamilie, Zell-Zell-Adhäsionen ermöglicht. Integrine vermitteln die RASF-Bindung an Fibronectin-haltige Komponenten des Knorpels (Ishikawa H et al., 1996), COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*) (Neidhart M et al., 2005) und verschiedene Kollagene (Sarkissian M und Lafyatis R, 1999). Sie sind jedoch nicht nur für die Zelladhäsion verantwortlich, sie fungieren auch als Signalmoleküle (Hynes RO, 1992; Berton G und Lowell CA, 1999; Hynes RO, 2002; Ginsberg MH et al., 2005). Dabei ist die Richtung der Signalübertragung bidirektional. Beim „*inside-out-signaling*“ kommt es durch intrazelluläre Signale zu Konformationsänderungen des Rezeptors, der eine starke Ligandenbindung ermöglicht. Die Ligandenbindung an die Integrine führt zum „*outside-in-signaling*“. Diese Prozesse spielen u. a. bei der Regulation der Zellbewegung, der Zellmorphologie, des Zellwachstums sowie die Expression verschiedener Gene eine Rolle. Im Verlauf der RA aktivieren Integrine zentrale intrazelluläre Signalkaskaden, die bspw. zur Expression von MMP führen (Ben-Horin S und Bank I, 2004) sowie die erhöhte Expression von z. B. Proto-Onkogenen (z. B. *c-fos*) oder anderen Transkriptionsfaktoren (Kontny E et al., 1995; Dooley S et al., 1996) in verschiedenen synovialen Zellen bewirken.

Es konnte gezeigt werden, dass RASF-Adhäsion über die Integrine  $\alpha_v\beta_1$  und  $\alpha_5\beta_1$  in einer erhöhten Proliferation der Fibroblasten resultiert (Sarkissian M und Lafyatis R, 1999). Des Weiteren wird die Fas-induzierte Apoptose von RASF durch Bindung von

Integrin  $\alpha_5\beta_1$  an Fibronectin reduziert. Somit tragen Zell-Matrix-Interaktionen aktiv zur synovialen Hyperplasie bei (Kitagawa A et al., 2006). Durch eine Integrin-vermittelte Bindung der RASF an COMP kommt es weiterhin zur verstärkten Expression von Galectin-3, wodurch die Entzündung verstärkt und ebenfalls die Apoptose gehemmt wird (Neidhart M et al., 2005).

### **VCAM-1**

Das zur Immunglobulinfamilie gehörende VCAM-1 wurde zuerst auf Endothelzellen nachgewiesen. Es vermittelt hier die Bindung von Lymphozyten (Osborn L, 1989). Somit spielt VCAM-1 u. a. eine Rolle bei der transendothelialen Migration der Leukozyten zu Entzündungsherden. VCAM-1 wird vermehrt im RA-Synovium exprimiert, wobei die Expression durch RASF konstitutiv ist. Die Regulation erfolgt durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), dessen Aktivität im RA-Synovium und speziell in RASF erhöht ist (Marok R et al., 1996). Die VCAM-1-Expression wird u. a. durch die Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 und IL-18 hochreguliert (Marlor CW et al., 1992; Morales-Ducret J et al., 1992; Wilkinson LS et al., 1993; Li P et al., 2000; Morel JC et al., 2002), wodurch die Fähigkeit zur Bindung an andere Zellen bzw. an den Rezeptor VLA-4 (*very late antigen-4*; Integrin  $\alpha_4\beta_1$ -Untereinheit) erhöht ist (Elices MJ et al., 1990; Müller-Ladner U et al., 1997).

#### **1.3.1.4 Zelluläre Migration**

Die Zellmigration spielt bei vielen physiologischen Prozessen eine Rolle. Dazu gehört die Rekrutierung von Immunzellen zum Ort der Immunantwort. Während der adaptiven und zellulären Immunantwort werden zirkulierende Leukozyten zum Verlassen des Blutstroms angeregt, um zu lymphatischen Organen oder zu infiziertem bzw. entzündetem Gewebe zu gelangen. Dabei kommt es nach Bindung zum Selektin-mediierten *rolling* der Leukozyten entlang der durch Entzündung oder Infektion aktivierten Endothelzellen. Die Sekretion verschiedener Chemokine durch geschädigte Zellen und Entzündungszellen an der betroffenen Stelle führt zur Aktivierung, die in einer erhöhten Expression von Integrinen, VCAM-1 und ICAM-1 resultiert. Über Adhäsionsmoleküle kommt es zur starken Bindung der Leukozyten an

Endothelzellen und nachfolgend zur Transmigration durch die Gefäßwände (Cotran RS und Pober JS, 1990; Butcher EC, 1991; Springer TA, 1994).

Auch bei der Tumor-Metastasierung ist die Migration ein wichtiger Schritt. Dabei erfolgt nach Abtrennung der Zellen vom Primärtumor die Invasion des umgebenden Gewebes oder der Basalmembran, wodurch der Eintritt in das Blutgefäß- oder Lymphsystem ermöglicht wird. Nach Erreichen eines vom Primärtumor entfernten Organs kann eine Extravasation in das Gewebe sowie die Proliferation der Zellen und nachfolgend eine Induktion der Angiogenese stattfinden. Dabei werden durch die Tumorzellen Prozesse der Apoptose oder die Reaktionen des Immunsystems umgangen (Hunter KW et al., 2008). Häufig werden Metastasen in gut durchbluteten Geweben, in Organen der Blutreinigung oder aber auch im Knochenmark gefunden. Eine gezielte Migration scheint dabei nicht stattzufinden.

Bei Verletzungen der Haut, des Endothels oder anderer Gewebe kommt es bei der anschließenden Wundheilung ebenfalls zur Migration verschiedener Zellen. Die Migration von Neutrophilen und Monozyten bzw. Makrophagen führt zur Sekretion von Chemokinen und Wachstumsfaktoren (Hübner G et al., 1996; Martin P, 1997; Singer AJ und Clark RA, 1999; Quan TE et al., 2004). Folgen sind die Aktivierung und Rekrutierung von gewebsständigen Fibroblasten durch Chemokine zum betroffenen Ort sowie eine erhöhte Angiogenese. Fibroblasten spielen in der ersten entzündlichen Phase der Wundheilung eine essentielle Rolle. Sie migrieren lokal durch das Gewebe zur geschädigten Stelle, adhären an die EZM, bauen das geschädigte Gewebe ab und sezernieren Matrixproteine zum Aufbau einer gesunden Matrix (Moore BB et al., 2005).

## **1.4 Der synoviale Fibroblast in der rheumatoiden Arthritis**

SF spielen bei der normalen Gelenkfunktion eine wichtige Rolle. Sie sind für die Produktion von Kollagenen und anderen Molekülen des Bindegewebes, aus denen die Gelenkkapsel besteht, sowie für den kontinuierlich ablaufenden physiologischen Matrixumbau verantwortlich. Durch ihr Hauptsekretionsprodukt, Hyaluronsäure und andere Proteoglykane, wird ein reibungsloses Gleiten der Gelenkflächen gegeneinander ermöglicht. Eine wichtige Aufgabe besteht in der Aufrechterhaltung der Struktur und Biegsamkeit des Gelenks sowie der Umbildung des artikulären

Knorpels durch kontrollierte Sekretion von Matrix-degradierenden Enzymen und deren Inhibitoren (Abeles AM und Pillinger MH, 2006; Mor A et al., 2005). Dieser kontinuierliche Ab- und Aufbau der Knorpelmatrix ist notwendig, da durch die ständige Bewegung und Belastung der Gelenke auftretende geringgradige Destruktionen des Knorpels ausgeglichen werden müssen.

In der Pathophysiologie der RA spielen neben Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen, Neutrophilen, Chondrozyten und Osteoklasten vor allem aktivierte SF eine entscheidende Rolle (Gravallese EM, 2002; Ma Y und Pope RM, 2005; Skapenko A et al., 2005; Yasuda T, 2006). Sie sind in großer Anzahl im RA-Synovium zu finden. Die Aktivierung der RASF im *lining layer* findet durch das angeborene Immunsystem (v. a. durch *Toll-like* Rezeptoren) (Brentano F et al., 2009), durch inflammatorische Zytokine sowie durch weitere Mediatoren schon früh im Verlauf der RA statt. Durch den Kontakt mit anderen Zellen, z. B. mit T-Zellen, wird dieser Zustand verstärkt (Gay S et al., 1993; Müller-Ladner U et al., 1996; Fassbender HG, 1998; Konttinen YT et al., 2000). Im aktivierten Zustand sind Veränderungen der SF hinsichtlich ihrer Morphologie, ihres Charakters und ihrer Aufgaben zu beobachten. Erste Versuche von Fassbender (Fassbender HG, 1983) konnten zeigen, dass RASF erhebliche Veränderungen im Vergleich zu normalen Fibroblasten aufweisen. Große Zellkerne und mehrere Nukleoli deuten auf einen aktiven RNA-Metabolismus hin. Das aggressive Verhalten dieser Zellen könnte durch extrazelluläre Faktoren oder durch Veränderungen der intrazellulären Signalwege verursacht werden.

Die spezifische SF-Aktivierung hebt die RA von anderen entzündlichen Erkrankungen ab. RASF adhären am Gelenkknorpel, invadieren und degradieren ihn aktiv. Auch Knochen kann von der Destruktion betroffen sein (Müller-Ladner U et al., 1996; Lafyatis R et al., 1989; Buckley CD et al., 2001; Neumann E et al., 2002; Huber LC et al., 2006). RASF tragen durch die Produktion inflammatorischer Zytokine, z. B. durch IL-1 $\beta$ -Sekretion nach T-Zell-Bindung (Yamamura, 2001; Nakatsuka, 1997), und Matrix-degradierender Enzyme in hohem Maße zum Fortschritt und zur Aufrechterhaltung der Erkrankung bei.

Die Überexpression von Proto-Onkogenen wie z.B. *c-myc*, *fos* und *ras* (Trabandt A et al., 1990; Qu Z et al., 1994; Müller-Ladner U et al., 1995), die reduzierte, veränderte oder fehlende Expression von Tumorsuppressorgenen wie bspw. p53, PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) oder PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) (Rème T et al., 1998; Müller-Ladner U und Nishioka K, 2000; Cha HS et al., 2006),

Veränderungen der Faktoren des Zellzyklus (Seemayer CA et al., 2003a; Woods JM et al., 2006) und die Hochregulierung von Transkriptionsfaktoren (z. B. NF- $\kappa$ B) sind Merkmale aktivierter RASF (Müller-Ladner U et al., 1995). Diese sowie anti-apoptotische Faktoren (z. B. bcl-2, SUMO-1, FLIP) tragen wahrscheinlich durch reduzierte Apoptose zur verlängerten Lebensdauer der RASF bei. Nur 3% der RASF gehen in Apoptose (Matsumoto S et al., 1996; Korb A et al., 2009). Dies führt zur längeren Expression Matrix-degradierender Enzyme durch RASF. Da RASF zudem teilweise ihre Kontaktinhibition verlieren, werden sie oftmals als tumorartige Zellen gesehen, allerdings agieren sie nicht autonom und antworten und reagieren auf verschiedene Signale (Fassbender HG, 1983; Lafyatis R et al., 1989; Ritchlin C, 2000; Abeles AM und Pillinger MH, 2006).

Der aktivierte Phänotyp der RASF wurde im Laufe der Jahre in vielen Studien charakterisiert. RASF sezernieren vermehrt proinflammatorische und matrixdestruktive Mediatoren wie Zytokine (z. B. IL-6, IL-1), Chemokine (z. B. IL-8, IL-16, MCP-1, RANKL), Wachstumsfaktoren (z. B. bFGF, VEGF, TGF $\beta$ ) und Matrix-degradierende Enzyme (z. B. MMP, Membran-gebundene MMP, Cathepsine) (Pap T et al., 2000b; Ritchlin C, 2000; Müller-Ladner U und Gay S, 2002; Müller-Ladner U et al., 2007).

Durch die beschriebenen und weitere RASF-beeinflusste Prozesse (Angiogenese, Entzündung, Chemoattraktion, Knochenerosion) (Ritchlin C, 2000) kommt es zur fortschreitenden Zerstörung des Knorpels und Knochens (Konttinen YT et al., 2000; Mor A, 2005). Im Verlauf der RA werden weitere Zellen rekrutiert, die zusätzliche inflammatorische Zellen anziehen, proinflammatorische Zytokine synthetisieren und somit den aktivierten Zustand der RASF, aber auch die Bildung von Osteoklasten verstärken (Pettit AR et al., 2006; Tarner IH et al., 2003). Direkte Mechanismen, wie die Hochregulierung verschiedener Adhäsionsmoleküle, die Produktion von MMP (Müller-Ladner U et al., 1996) und indirekte Mechanismen, wie die Hochregulierung von RANKL (Nakano K, et al., 2004; Pettit AR et al., 2006) tragen zur Knorpel- bzw. Gelenkzerstörung bei.

Obwohl SF nicht zu den Immunzellen zählen, exprimieren sie HLA-DR-Moleküle, können zu einem gewissen Maße als Antigen-präsentierende Zellen fungieren und damit T-Zellen stimulieren (Vallejo AN et al., 2003; Sawai H et al., 2005). Bis heute gibt es allerdings keinen Marker, der RASF von anderen SF oder Fibroblasten aus anderen Bereichen des Körpers unterscheidet. Lediglich über Expressionsprofile und

die verstärkte Produktion proentzündlicher und prodestruktiver Faktoren lässt sich eine Unterscheidung von RASF zu Kontrollen vornehmen. Bis heute stehen für durchflusszytometrische (FACS-) sowie immunhistochemische Analysen lediglich allgemeine Fibroblastenmarker, wie Vimentin, zum Nachweis von Fibroblasten zur Verfügung.

#### **1.4.1 Rheumatoide synoviale Fibroblasten und Matrixdegradation**

Die von RASF exprimierten Mitglieder der mehr als 20 Enzyme umfassenden MMP-Familie der zinkabhängigen Endopeptidasen können in ihrer Gesamtheit nahezu alle Komponenten der EZM abbauen. MMP werden von entsprechenden Zellen sezerniert oder liegen auf den Zellen in der Zellmembran vor (*membrane-type MMP*; MT-MMP) (Sato H et al., 1994; Pap T et al., 2000b). Unter normalen und pathologischen Bedingungen sind MMP z. B. bei der interzellulären Kommunikation, der Zellmigration sowie der Tumor-Progression von Bedeutung. Weitere wichtige Rollen kommen ihnen in der Morphogenese, Gewebewiederherstellung, Wundheilung oder nach Verletzungen zu. Bei der RA und beim Tumorwachstum sowie der Metastasierung sind MMPs für die Migration entscheidend, indem sie durch Matrixabbau Raum für die Invasion in verschiedene Gewebe schaffen. MMP sind in der RA die wichtigsten Matrix-abbauenden Enzyme. RASF, die MMP-1, MMP-3, MMP-9 oder MMP-10 sezernieren, weisen eine signifikant erhöhte Invasionsfähigkeit auf und sind damit die für die Knorpeldestruktion primär verantwortlichen Zellen (Müller-Ladner U et al., 1996; Neumann E et al., 2002). Hierbei korreliert die Menge der MMP-Expression mit der Knorpelinvasion (Tolboom TC et al., 2002). MMP sind weiterhin bei der Leukozyteninvasion in das betroffene Gelenk und der Regulation inflammatorischer Prozesse von Bedeutung. Ausnahmen sind hierbei MMP-2 und MMP-9, die sowohl pro- als auch antiinflammatorische Funktionen wahrnehmen können (Le NT et al., 2007).

Die fünf Untergruppen der MMP werden in Kollagenasen, Stromelysine, Matrilysine und MT-MMP unterteilt (Burrage PS et al., 2006; Pap T et al., 2000b). Weitere MMP, wie MMP-12, MMP-19, MMP-20 oder MMP-28, gehören keiner der Untergruppen an (Visse R und Nagase H, 2003). MMP bestehen aus hochkonservierten Strukturen: einer N-terminalen Signalsequenz, dem N-terminalen

Propeptid, einer katalytischen Domäne sowie einer C-terminalen Hämopexin-Domäne, die die Substratspezifität festlegt (Nagase H et al., 2006; McCawley LJ und Matrisian LM, 2001). Sie werden zunächst in einer inaktiven, Zink enthaltenden Form, die als proMMP bezeichnet wird, gebildet und durch Entfernen des Propeptids, durch andere MMP oder Proteasen aktiviert (Visse R und Nagase H, 2003).

Die Aktivität der MMP wird durch die Aktivierung ihrer Proenzyme sowie durch Inhibitoren kontrolliert. Zu den Inhibitoren zählen  $\alpha$ 2-Makroglobulin, andere Proteasen und vor allem spezifische TIMP. Bisher sind vier unterschiedliche TIMP bekannt, die in der Lage sind, alle MMP zu inhibieren (Visse R und Nagase H, 2003). Durch das Zusammenspiel dieser beiden Enzymgruppen kommt es bei gesunden Personen zu einem Gleichgewicht zwischen Matrixabbau und -aufbau. Bei der RA liegt ein Ungleichgewicht zwischen der Aktivität der MMP und TIMP vor. Die Folge ist eine gesteigerte Freisetzung und Aktivität der MMP und damit einer Verschiebung in Richtung Matrixdestruktion. Die Expression verschiedener MMP wird durch verschiedene Faktoren (z. B.  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$ ) oder über die Aktivierung intrazellulärer Signale, wie beispielsweise ERK, JNK,  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , sowie von T-Zellen und Makrophagen sezernierten Mikropartikeln induziert (Müller-Ladner U et al., 1996; Aidinis V et al., 2003; Distler JH et al., 2005). Die Kollagenasen MMP-1 und MMP-13 sind bei der RA dominierend am Abbau des Typ II Kollagens beteiligt, das den Hauptbestandteil des Knorpels bildet (Eyre D, 2002; Burrage PS et al., 2006). Im Gegensatz dazu ist die Expression von TIMP und der Gene, die Matrixkomponenten kodieren, herunterreguliert.

Weitere zentrale Zellen des Knorpelabbaus sind die Chondrozyten. Proinflammatorische Zytokine veranlassen sie u. a. zur Produktion verschiedener proteolytischer Enzyme und damit zur Knorpeldegradation (Borden P et al., 1996; Aida Y et al., 2005). Daher trägt nicht nur das Einwandern der RASF zur Destruktion des Knorpels bei, sondern auch die perichondrozytäre Degradation.

## 1.5 SCID-Mausmodell

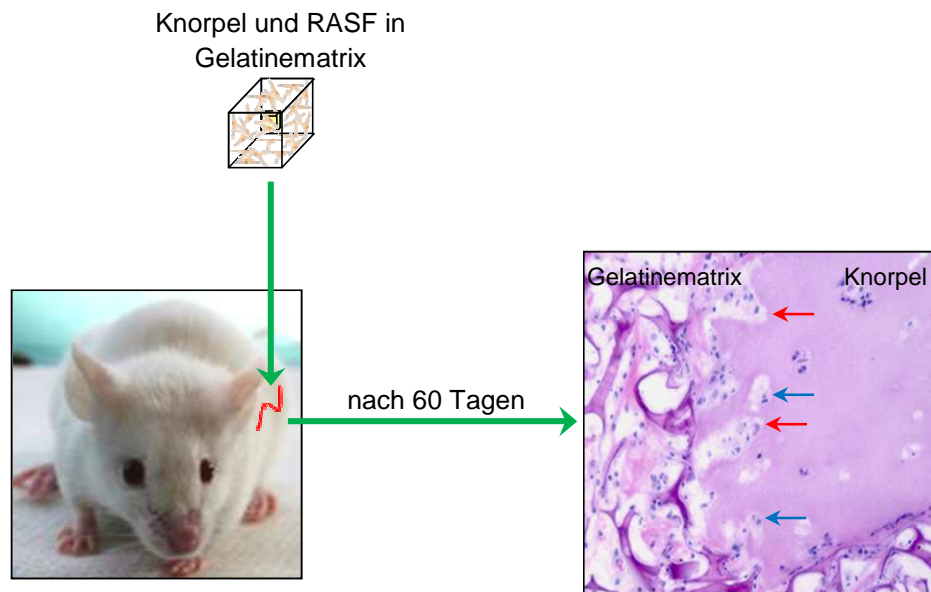
Für das Verständnis der Erkrankung bezüglich ihrer Pathophysiologie und zur Entwicklung neuer Therapieansätze sind Tiermodelle, die klinische Symptome und Charakteristika der RA darstellen, unerlässlich. Es gibt bisher jedoch kein Tiermodell,

dass den Verlauf der RA mit allen Komponenten und Eigenheiten zeigen kann. Allerdings können mittels verschiedener Tiermodelle unterschiedliche Aspekte der RA unter definierten Bedingungen untersucht werden.

Um die schwerwiegende Eigenschaft der RA, die Zerstörung des Knorpels und Knochens, darzustellen, wurde ein Modell entwickelt, welches die molekularen Eigenschaften und zellulären Interaktionen des humanen Gewebes verdeutlichen kann: das *severe combined immunodeficiency* (SCID)-Mausmodell der RA. SCID-Mäuse sind nicht in der Lage, funktionsfähige T- und B-Lymphozyten zu bilden, daher weisen sie eine Störung ihrer zellulären Immunantwort auf. Implantierte spezie fremde Gewebe oder Zellen werden nicht abgestoßen. Dieses Tiermodell legt bei Verwendung isolierter RASF den Fokus auf diesen Zelltyp und dessen Rolle in der Knorpeldestruktion. Interaktionen zwischen RASF oder humanem RA-Synovium mit Knorpel können *in vivo* über einen bis zu 300 Tage andauernden Zeitraum in Abwesenheit anderer Zellen (z. B. Immunzellen) oder proentzündlicher Mediatoren untersucht werden (Müller-Ladner U et al., 1996; Neumann E et al., 2002; Pierer M et al., 2003).

Im SCID-Mausmodell werden RASF in engen Kontakt mit dem koimplantierten Knorpel gebracht. Im ursprünglichen SCID-Mausmodell der RA wurde zunächst komplettes RA-Synovium zusammen mit humanem Knorpel implantiert. In weiteren Versuchen erfolgte die Koimplantation der RASF und des Knorpels unter die Nierenkapsel. Vorteil dieser beiden Methoden waren die Analyse der Gewebeinteraktionen, aber auch die der Zell-Knorpel-Interaktionen. In der darauffolgenden *inverse wrap*-Variation des Tiermodells wurde, wie in Abb. 5 dargestellt, ein Knorpelstück in eine Trägermatrix aus Gelatine oder Kunststoff eingesetzt, anschließend mit der vorbereiteten RASF-Suspension getränkt und der Knorpel-Zell-Komplex subkutan implantiert (Müller-Ladner et al., 1996; Judex M et al., 2001; Neumann E et al., 2002). Die Verwendung frischen Knorpels ist bei allen Versuchen essenziell, da die Invasivität der RASF in den Knorpel nach Lagerung für 24 h bei 4°C oder bei Raumtemperatur deutlich nachlässt (Pap T et al., 2000c). Nach 60 Tagen erfolgte die Implantatentnahme und histologische Analyse der implantierten Knorpel. Die RASF behalten im Tiermodell über diesen Zeitraum ihr aggressives und destruktives Verhalten bei. Sie sezernieren matrixabbauende Enzyme, invadieren den koimplantierten Knorpel und vermitteln eine perichondrozytäre Knorpeldegradation (Abb. 5) (Müller-Ladner et al., 1996; Neumann

E et al., 2002). Mit Hilfe dieses Tiermodells konnte gezeigt werden, dass RASF maßgeblich an der Zerstörung des Gelenks, insbesondere des Knorpels, beteiligt sind. Die Destruktion erfolgt in Abwesenheit anderer Zellen, wie z. B. Makrophagen oder Lymphozyten. Das SCID-Mausmodell kann daher zur Analyse der Interaktion eines speziellen Zelltyps mit Knorpel oder von bestimmten Geweben verwendet werden.



**Abb. 5:** SCID-Mausmodell der rheumatoiden Arthritis. SCID-Mäusen wird subkutan ein mit RASF getränkter Knorpel-Trägermatrix-Komplex implantiert. Nach 60 Tagen wird der Komplex entnommen und histologisch analysiert. Eine starke Invasion der RASF in den Knorpel (rote Pfeile) sowie eine perichondrozytäre Degradation des Knorpels (blaue Pfeile) lassen sich im explantierten Knorpel nachweisen.

## 1.6 Fragestellung

Charakteristisch für die rheumatoide Arthritis (RA) ist die fortschreitende Ausbreitung und Zerstörung der Gelenke. Die Erkrankung beginnt in einzelnen oder wenigen Gelenken, kann jedoch in ihrem Verlauf die Mehrzahl der Gelenke betreffen. In der Pathophysiologie der RA nehmen aktivierte RA synoviale Fibroblasten (RASf) eine zentrale Rolle ein, indem sie aktiv an humanem Knorpel adhären, in ihn einwandern und damit zerstören.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Migrationspotential der RASf und deren Rolle bei der Ausbreitung der RA mit Hilfe des SCID-Mausmodells detailliert zu analysieren. Weiterhin sollten der Weg durch den Organismus sowie Mechanismen und Faktoren aufgedeckt werden, die zur Migration der RASf beitragen oder sie verursachen.

Folgende Punkte sollten im Verlauf der Arbeit durchgeführt werden:

- Untersuchung des Migrationspotentials der RASf über weite Distanzen
- Analyse des Migrationswegs im Organismus
- Einfluß der Wundheilung auf die RASf-Migration
- Faktoren, die auf die Migration der RASf Einfluß nehmen, z. B. extrazelluläre Matrix, Chondrozyten
- Rolle der Chemokine in der gerichteten und ungerichteten Migration
- Analyse der Adhäsionsmoleküle an der Invasionszone in den Knorpel
- Hemmung der Migration und Adhäsion der RASf *in vivo* und *in vitro*
- Analyse der RASf-Population auf Subpopulationen

Die erhaltenen Daten sollten Aufschluß über den fortschreitenden Transfer der Erkrankung zu anderen Gelenken bei Patienten mit rheumatoider Arthritis erbringen.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Verwendete Organismen

#### 2.1.1 Tiere

Für die *in vivo*-Migrationsexperimente wurden weibliche, 4-6 Wochen alte Crl-scidBR-Mäuse (Charles River, Sulzbach) verwendet. Diese immundefizienten Tiere zeigen eine schwere Störung in der Bildung funktionsfähiger T- und B-Lymphozyten und sind daher nicht in der Lage, implantierte Gewebe abzustößen. Die SCID-Mäuse wurden unter keimarmen Bedingungen gezüchtet und am Institut weiter unter diesen Bedingungen gehalten.

Die Genehmigung zur Durchführung der Experimente nach Tierschutzgesetz erfolgte durch das Regierungspräsidium Darmstadt.

#### 2.1.2 Adenoviren

Der für die Transduktion der RASF verwendete Adenovirus des Typs Ad5 weist Deletionen in den Replikationsloki E1 und E3 ( $\Delta E1/\Delta E3$ ) auf. Hier wurde stattdessen AdEGFP inseriert. Dieses Gen kodiert für das grün fluoreszierende Protein (*enhanced green fluorescent protein*; EGFP). Die Genregulation erfolgte durch einen Cytomegalovirus (CMV)-Promotor. Die Adenoviren wurden freundlicherweise von PD Dr. Robert Dinser zur Verfügung gestellt.

Die Experimente zur Durchführung nach Gentechnikgesetz S1 und S2 wurden zuvor vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt.

## 2.2 Chemikalien und Materialien

**Tab. 2:** Verwendete Chemikalien und sonstige Materialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
5 X AMV-Puffer	Promega, Mannheim
5100 <i>Cryo 1°C Freezing Container</i>	Nalgene/Fisher Scientific, Schwerte
6- <i>well</i> -Platten	Greiner, Frickenhausen
<i>Adhesive Cap 500 opaque</i>	P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried
Aquatex	Merck, Darmstadt
Bepanthen Augensalbe	Bayer Vital, Leverkusen
Boyden-Kammer	Neuroprobe, Gaithersburg, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (bovines Serum Albumin)	Roth, Karlsruhe
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth, Karlsruhe
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> ), 1 g/l Glukose	PAN Biotech, Aidenbach
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Einfrierröhrchen (2 ml)	Greiner, Frickenhausen
EndoFrost-Pellets	Roeko, Langenau
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Roth, Karlsruhe
Erythrozytenlyse-Puffer	QIAGEN, Hilden
FCS (fötales Kälberserum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
<i>gelfoam absorbable gelatin sponge</i>	Pfizer, New York, USA
Giemsa-Lösung	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
Heparin-Natrium	B. Braun, Melsungen
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	PAA Laboratories, Cölbe
Insulinspritzen (0,5 ml; 0,3 ml)	BD Medical, Heidelberg
Kaliumaluminiumsulfat	Merck, Darmstadt
Kanülen (diverse)	B. Braun, Melsungen
Ketamin-ratiopharm Injektionslösung (500 mg/10 ml)	Ratiopharm, Ulm
LightCycler Kapillaren (20µl)	Roche, Mannheim

May-Grünwald-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>membrane slides</i>	PALM Microlaser Technologies, Bernried
<i>MicroAmp Reaction Tubes</i> ; 8/12 tubes/stripe, 0,2 ml	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Microcon-Säulen	Millipore, Bedford, USA
OCT TissueTek	Sakura Finetek, Heppenheim
OP-Zubehör (sterile Tupfer u. ä.)	Hartmann, Heidenheim
physiologische NaCl-Lösung, 0,9%	B. Braun, Melsungen
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	PAA Laboratories, Cölbe
PCR Nukleotid-Mix	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
Polycarbonat PVPF-Membran, 8µm	GE Osmonics, Minnetonka, USA
RNase-freies dH <sub>2</sub> O	Applied Biosystems, Darmstadt
RNasin (RNase Inhibitor)	Promega, Mannheim
Rompun 2% Injektionslösung (Wirkstoff: Xylazin)	Bayer Vital, Leverkusen
RT-PCR <i>Grade Water</i>	Applied Biosystems/Ambion, Darmstadt
Saponin	Calbiochem, Darmstadt
Seralon blau Ds-12	Serag Wiessner, Naila
Spritzen (diverse)	B. Braun, Melsungen
SuperFrost Plus Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> /75 cm <sup>2</sup> )	Corning, Wiesbaden
Zellsieb 70 µm	BD Biosciences, Heidelberg
Zytospin-Filterpapier	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Die übrigen, nicht genannten Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Karlsruhe und Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen.

## 2.3 Medien und Lösungen

**Tab. 3:** Verwendete Medien und Lösungen. Sofern nicht anderweitig vermerkt, erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur

Bezeichnung	Bestandteile
Auftragspuffer	60% Glycerol, 0,25% Xylencyanol, 0,25% Bromphenolblau
DEPC-Wasser	0,1% DEPC, H <sub>2</sub> O; ü.N. bei Raumtemperatur rühren, autoklavieren
Einfriermedium	FCS, 10% DMSO; Lagerung: 1 Woche bei 4 °C
Eosin-Lösung	1% Eosin, H <sub>2</sub> O; filtrieren, dunkel lagern; vor Gebrauch einige Tropfen 96%ige Essigsäure zugeben
FACS-Puffer	1 x PBS, 1% BSA; Lagerung bei 4°C
Hämatoxylin-Lösung	0,1% Hämatoxylin, 0,2 g/l Natriumjodat, 50 g/l Kaliumaluminiumsulfat; vollständig in H <sub>2</sub> O lösen; 50 g/l Chloralhydrat, 1 g/l Zitronensäure; filtrieren, dunkel lagern
PBNS-Puffer	1 x PBS, 1% BSA, 0,1% Natriumazid, 0,5% Saponin; Lagerung bei 4°C
TAE-Puffer	40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA
Zellkulturmedium	500 ml DMEM, 10% hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES; Lagerung bei 4 °C

## 2.4 Enzyme

**Tab. 4:** Verwendete Enzyme (Zellkultur und reverse Transkription (RT))

Bezeichnung	Hersteller
Accutase	PAA Laboratories, Cölbe
AMV <i>Reverse Transcriptase</i>	Promega, Mannheim
Dispase II	PAN, Aidenbach
Kollagenase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	QIAGEN, Hilden
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Cölbe

## 2.5 Antikörper und Proteine

**Tab. 5:** Primärantikörper (für Immunhistochemie (IHC) und FACS-Analysen)

Antigen/Name	Spezifität	Verd.	Hersteller
Collagen IV (IHC)	Maus anti-human	1:50	DAKO, Hamburg
Follistatin (IHC)	Maus anti-human	1:100	R&D Systems, Wiesbaden
GFP (FACS)	Kaninchen anti-GFP	1:5000	abcam, Cambridge, UK
H-2D <sup>d</sup> (IHC)	Maus anti-Maus	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
IL-1 R1 (IHC)	Ziege anti-Maus	1:25	R&D Systems, Wiesbaden
MHC class 1 $\alpha/\beta$ (FACS)	Maus anti-human	1:25-100	abcam, Cambridge, UK
MHC class I (IHC)	Ratte anti-Maus	1:200	abcam, Cambridge, UK
Mitochondria (FACS)	Maus anti-human	1:20	Chemicon, Hofheim
MMP-13 (IHC)	Ziege anti-human	1:100	abcam, Cambridge, UK
Vimentin (IHC, FACS)	Maus anti-human	1:100	DAKO, Hamburg

**Tab. 6:** Sekundärantikörper (für IHC und FACS-Analysen)

Bezeichnung	Spezifität	Verd.	Hersteller
<i>Histofine Simple Stain MAX PO (Multi) Anti-mouse, -rabbit</i>	anti-Maus, anti-Kaninchen	-	Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan
<i>Histofine Simple Stain MAX PO (G) Anti-goat</i>	anti-Ziege	-	Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan
<i>Cy2-conjugated goat anti-mouse IgG; Fc<math>\gamma</math> Subclass I specific</i>	Ziege anti-Maus	1:100	Dianova, Hamburg
anti-Maus Ig	Ziege anti-Maus	1:50	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Ratte Ig	Ziege anti-Ratte	1:200	BD Pharmingen, Heidelberg

**Tab. 7:** Antikörper und Proteine (für *in vivo*- und *in vitro*-Migrationsexperimente)

Antigen/Name	Spezifität	Konz.	Hersteller
Adalimumab (Humira)	anti-TNF $\alpha$ (human)	40 mg/kg KG	Abbott Laboratories, Wiesbaden
CCL19	Ligand für CCR7	500 ng/ml	R&D Systems, Wiesbaden
CCR 7	Maus anti-human	25 $\mu$ g/ml	R&D Systems, Wiesbaden
Tocilizumab (Actemra)	anti-IL-6 Rezeptor (human)	8 $\mu$ g/mg KG	Roche Pharma, Grenzach-Whylen
VCAM-1	Maus anti-human	2 mg/kg KG	abcam, Cambridge, UK

**Tab. 8:** Blockierungsreagenzien, Isotyp-Kontrollen und Zubehör für IHC und FACS

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verd./Konz.</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Blockierungsreagenzien</b>		
BSA	2%	Roth, Karlsruhe
Sucofin Magermilchpulver	2%-5%	TSI GmbH, Zeven
Normalserum aus Kaninchen	2%	Dianova, Hamburg
Normalserum aus Maus	2%	Dianova, Hamburg
Normalserum aus Ziege	2%	Dianova, Hamburg
Rotiblock	1:5	Roth, Karlsruhe
<b>Isotypen</b>		
Maus IgG1	1:100	eBiosciences, San Diego, USA
Maus IgG1 $\kappa$	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IgG2a	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
Ziege IgG	1:100	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
<b>Konjugat</b>		
Meerrettichperoxidase-konjugiertes Streptavidin	1:600	Dianova, Hamburg
<b>Entwicklerkit</b>		
AEC <i>Substrate Kit</i>	lt. Herstellerangaben	Vector Laborat., Burlingame, USA

## 2.6 Molekularbiologische und immunologische Kits

**Tab. 9:** Verwendete Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Mouse TNFalpha/TNFSF1A Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>MycoSensor PCR Assay Kit</i>	Stratagene, La Jolla, USA
<i>QuantiTect SYBR Green PCR Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>PicoPure RNA Isolation Kit</i>	MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, USA
<i>RNeasy Plus Micro Kit</i>	QIAGEN, Hilden,
<i>RNeasy Mini Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>RNase-free DNase Set</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Taq PCR Master Mix Kit</i>	QIAGEN, Hilden

## 2.7 Komponenten der extrazellulären Matrix

**Tab. 10:** Zur Analyse der Migration der synovialen Fibroblasten verwendete Matrices

<b>Matrix</b>	<b>Hersteller</b>
Aggrekan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fibronectin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>PuraMatrix Peptide Hydrogel</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>Matrigel Basement Membrane Matrix</i>	BD Biosciences, Heidelberg
<i>Growth Factor Reduced Matrigel Matrix</i>	BD Biosciences, Heidelberg
Kollagen Typ II	MD Biosciences, Egg b. Zürich, Schweiz

Das Ansetzen bzw. Lösen der verschiedenen Matrices erfolgte nach Angaben des jeweiligen Herstellers.

## 2.8 Oligonukleotide (*primer*)

Der Entwurf der verwendeten Oligonukleotide erfolgte anhand der vorliegenden Sequenz des entsprechenden Gens oder mit Hilfe des Programms „Primer3“ ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) und wurde mit „OligoAnalyzer 3.0“ (<http://eu.idtdna.com/Home/Home.aspx>) auf Dimere und andere Sekundärstrukturen überprüft. Die Überprüfung der Spezifität geeigneter *primer* erfolgte anschließend durch „BLAST Search“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Alle Oligonukleotid-Paare, die optimalen  $MgCl_2$ -Konzentrationen sowie die jeweiligen *primer*-Bindungstemperaturen (*annealing*-Temperatur;  $T_a$ ) sind in Tab. 11 zusammengefasst.

**Tab. 11:** Oligonukleotide. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> jeweils eine Arbeitskonzentration von 100 pmol/μl eingestellt.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung	MgCl <sub>2</sub> [mM]	T <sub>a</sub> [°C]
hGAPDH-qPCR-f	GGTGAAGGTCGGAGTCAACGGA	Referenzgen für <i>real time</i> PCR	3	48-58
hGAPDH-qPCR-r	GAGGGATCTCGCTCCTGGAAGA			
alpha1_f_CM	ACAGCGAAGAACCTCCTGAA	<i>forward</i> und <i>reverse primer</i> für Integrin α <sub>1</sub>	4,5	57
alpha1_r_CM	GACTGTCTCATTGGCAGCAA			
alpha2_f_CM	AGAAGTCTGTTGCCTGCGAT	<i>forward</i> und <i>reverse primer</i> für Integrin α <sub>2</sub>	4,5	56
alpha2_r_CM	CTTGGAAGACTGAGAGACGCC			
alpha3_f_CM	GCCTGCCAAGCTAATGAGAC	<i>forward</i> und <i>reverse primer</i> für Integrin α <sub>3</sub>	4	56
alpha3_r_CM	ACCTGAAGGTCCCTTGTGTG			
alpha 5 forw	CCTCAGTGCCGAGTTCACCAAG	<i>forward</i> und <i>reverse primer</i> für Integrin α <sub>5</sub>	4	60
alpha 5 rev	CACCAACAGCCACAGAGTATCC			
alphav_for	GCTCATCGTTTCCATTCCACT	<i>forward</i> und <i>reverse primer</i> für Integrin α <sub>v</sub>	3,5	50
alphav_rev	TCCAGCCTTCATTGGGTTTC			
beta1_f_CM	ATCCCAGAGGCTCCAAAGAT	<i>forward</i> und <i>reverse primer</i> für Integrin β <sub>1</sub>	4	56
beta1_r_CM	CCCCTGATCTTAATCGCAA			
beta4_for	AGTGTGTGTGTGGAGCCTGGTTG	<i>forward</i> und <i>reverse primer</i> für Integrin β <sub>4</sub>	3,5	57
beta4_rev	TCGCAGATGGTGTCCGTGTA			
beta5_f_CM	TGCCTTGCTTGGAGAGAAAT	<i>forward</i> und <i>reverse primer</i> für Integrin β <sub>5</sub>	4,5	56
beta5_r_CM	AATCTCCACCGTTGTTCCAG			
<i>sry forward</i>	GCGTATTCAACAGCGATGATTACAG	Nachweis des Y-chromosomalen <i>sry</i>	3	50
<i>sry reverse</i>	GTTACCCGATTGTCCTACAGCTTTG			

*Random primer* p(DN)<sub>6</sub> (Roche, Mannheim) wurden für die cDNA-Synthese verwendet.

## 2.9 Geräte und Software

**Tab. 12:** Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Cytospin II	Shandon Lipshaw Inc., Pennsylvania, USA
GeneAmp PCR System 9700	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
FACSCalibur	BD Biosciences, San Jose, USA
LC Carousel Centrifuge	Roche Diagnostics, Mannheim
Leica CM 3050S (Kryostat)	Leica Microsystems, Nussloch
Leica DC 200 (Kamera)	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica DM IRB (Mikroskop)	Leica Microsystems, Wetzlar
Leitz 1516 (Rotationsmikrotom)	Leica Microsystems, Nussloch
LightCycler 1.5	Roche Diagnostics, Mannheim
NanoDrop	peqlab Biotechnologie, Erlangen
P.A.L.M. MicroBeam C	P.A.L.M Microlaser Technologies, Bernried
Sunrise ELISA Reader	Tecan, Crailsheim
Genius I (Geldokumentation)	Syngene, Cambridge, UK

**Tab. 13:** Software für die unterschiedlichen Anwendungen

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Cell Quest Pro	BD Biosciences, San Jose, USA
IM 1000	Leica Microsystems, Wetzlar
LightCycler Software 3.5	Roche Diagnostics, Mannheim
Magellan 5	Tecan, Crailsheim
ND-1000 V3.5.2	peqlab Biotechnologie, Erlangen
PALM Robo Software V3.2	Carl Zeiss, München

## 3 METHODEN

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Gewebeentnahme

Die Synovialgewebe zur anschließenden Isolierung der SF, für die Immunhistochemie sowie für Implantationsexperimente, wurden im Rahmen von Routineoperationen (Gelenkersatz, Synovektomie) in der Orthopädie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, der orthopädischen Abteilung des Markus-Krankenhauses in Frankfurt sowie der orthopädischen Abteilung des Universitätsklinikums Regensburg in Bad Abbach entnommen. Die Gewebe stammten von Patienten mit nachgewiesener RA (n = 24) oder OA (n = 8). Bei RA Patienten wurden die 1987 vom „*American College of Rheumatology*“ (Arnett FC, 1988) ausgewiesenen Kriterien erfüllt (s. Tab. 1). Die Entnahme erfolgte mit der Genehmigung der Ethikkommissionen der Universitäten Gießen und Regensburg. Von allen Patienten lagen Einverständniserklärungen zur Verwendung der Gewebeproben für experimentelle Zwecke vor.

Für die SCID-Maus-Experimente wurden nicht-arthritische Knorpelareale von OA-Patienten (n = 40) verwendet, die sich am Tag der Knorpel-Implantation in SCID-Mäuse in der Orthopädie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg bzw. der orthopädischen Abteilung des Markus-Krankenhauses in Frankfurt einer Gelenkersatzoperation unterzogen. Es wurde hierbei ausschließlich gesunder, intakter Knorpel verwendet, was vor der Implantation makroskopisch und histologisch sichergestellt wurde. Weiterhin wurde SCID-Mäusen boviner Knorpel sowie isolierter muriner Gelenkknorpel implantiert. Die Isolierung des bovinen Knorpels erfolgte aus einem geschlossenen Schultergelenk unter sterilen Bedingungen. Bezogen wurde dieses von einem ortsansässigen Metzger. Der murine Knorpel bzw. die Gelenkköpfe wurden von SCID-Spendertieren gewonnen.

### 3.1.2 Einfrieren und Lagerung der Synovialgewebe

Nach der Entnahme erfolgte der Transport des Synovialgewebes auf Eis und die schnellstmögliche Weiterverarbeitung, um Abbauprozesse von RNA und Proteinen zu minimieren. Nach Präparation des Synoviums von den Knorpel-Knochenplatten wurde ein Teil des Gewebes in OCT TissueTek (Einfriermedium) eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Gewebe für eine spätere Immunhistochemie (als Kontrollgewebe oder zur Etablierung der verwendeten Antikörper) erfolgte bei -80°C. Der restliche Teil des präparierten Synoviums diente der Isolation von RASF, OASF oder der Implantation in SCID-Mäuse.

### 3.1.3 Isolation der synovialen Fibroblasten

Nach Präparation des Synoviums von den Knorpel-Knochenplatten unter sterilen Bedingungen wurde das Gewebe zunächst in kleine Stücke zerteilt und bei Raumtemperatur 1 h auf einem Schüttler in steriler Dispase-Lösung enzymatisch abgebaut. Die Lösung wurde anschließend durch ein Zellsieb gegeben, 10 min bei 300 x g zentrifugiert und die Zellen in Zellkulturmedium (ZKM) aufgenommen. Die isolierten RASF wurden (je nach Menge des gewonnenen Materials) in eine 75 cm<sup>2</sup>- oder 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche (ZKF) transferiert und bei 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 10% und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um Gewebereste und nicht adhärente Zellen zu entfernen. Anschließend wurde alle 48 h das Medium gewechselt. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen passagiert und weiter kultiviert.

Standardmäßig erfolgte die Analyse der Kulturen auf Mycoplasmenkontaminationen mittels des *Mycosensor PCR Assay Kits* nach Angaben des Herstellers.

### **3.1.4 Passagieren der synovialen Fibroblasten**

Unter sterilen Bedingungen wurden die SF mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 5 g/l Trypsin und 2 g/l EDTA bei 37°C für 3-5 min inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 5 ml ZKM und die Zentrifugation der Zellen 10 min bei 300 x g. Das Pellet wurde in ZKM resuspendiert und die SF jeweils zur Hälfte (1:2) oder zu einem Drittel (1:3) in neuen 75 cm<sup>2</sup>-ZKF ausgesät.

Die SF wurden für Experimente zwischen der 4. - 8. Passage verwendet. Zu diesem Zeitpunkt war sichergestellt, dass sich keine Makrophagen mehr in der Kultur befanden, da diese sich nicht durch die für die Fibroblasten verwendete Trypsinbehandlung ablösen. Die RASF wurden außerdem nur bis zu einer gewissen Passage verwendet, da sich ihr Genexpressionsmuster ab einem bestimmten Zeitpunkt ändert (Neumann E et al., 2009) und damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht mehr gewährleistet ist.

### **3.1.5 Einfrieren der synovialen Fibroblasten**

Zur Langzeitlagerung wurden die SF einer 75 cm<sup>2</sup> ZKF bei einer Konfluenz von ca. 90% abtrypsinisiert und 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen und je 2 ml in ein Einfrierrohrchen gegeben. Dieses wurde sofort auf Eis und anschließend in ein Einfriergefäß gestellt. Über Nacht erfolgte die Lagerung bei -80°C. Am nächsten Tag wurden die SF zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff transferiert.

### **3.1.6 Auftauen der synovialen Fibroblasten**

Nach Entnahme der SF aus flüssigem Stickstoff und kurzer Lagerung auf Trockeneis wurden die Zellen langsam bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 10 ml vorgewärmtes ZKM überführt und 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml ZKM aufgenommen in eine ZKM-enhaltende 75 cm<sup>2</sup>-ZKF transferiert. Nach 16-24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um nicht-

adhärente Zellen und eventuell verbliebenes und damit störendes DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend unter Standardbedingungen kultiviert.

### 3.1.7 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer.

## 3.2 Adenovirale Transduktion synovialer Fibroblasten

Mit Hilfe der adenoviralen Transduktion ist es möglich, Fremd-DNA in Zellen einzubringen. Um humane RASF in murinen Gelenken und im Blut lokalisieren zu können, wurden rekombinante adenovirale Vektoren verwendet, die virales AdEGFP enthielten. Sie stammten von replikationsdefizienten Typ 5-Adenoviren (Deletionen den Replikationsloki E1 und E3 ( $\Delta E1/\Delta E3$ )) ab.

Die RASF wurden zur adenoviralen Transduktion unter Standardbedingungen bis zu einer Konfluenz von ca. 85% in 75 cm<sup>2</sup>-ZKF kultiviert. Zur Transduktion wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Nach vorherigem Effizienztest wurde zur Infektion der RASF eine Partikelanzahl (MOI = *multiplicity of infection*) von 40 gewählt (entspricht dem 40fachen der Zellzahl). Die Adenoviren in entsprechender MOI wurden in PBS aufgenommen und zu den RASF gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37°C wurde der Viren-en thaltende Überstand abgenommen, die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend ZKM zugegeben. Es folgte eine Weiterkultivierung der RASF für 48 h bei 37°C/10% CO<sub>2</sub>. Nach Prüfung der erfolgreichen Transduktion mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgte die Injektion in SCID-Mäuse. Einige µl der Zellsuspension wurden zur Kontrolle der kontinuierlichen EGFP-Expression über die Versuchsdauer in 6-well-Platten weiterkultiviert.

### 3.3 Migrationsmodell der rheumatoiden Arthritis: SCID-Mausmodell

Das SCID-Mausmodell ist, wie in Kapitel 1.5 beschrieben, ein Tiermodell, in dem in einer dem menschlichen Gelenk ähnlichen Situation humane synoviale Zellen oder Gewebe mit Knorpel koimplantiert und analysiert werden können. In diesem Modell können Interaktionen zwischen verschiedenen Komponenten des humanen Gelenks isoliert *in vivo* untersucht werden.

Das ursprüngliche Koimplantationsmodell (Müller-Ladner U et al., 1996) wurde teilweise für die in dieser Arbeit präzisierten Versuche variiert.

#### 3.3.1 *Inverse wrap*-Implantationstechnik in SCID-Mäuse

Mit Hilfe der *inverse wrap*-Implantationstechnik wurde Knorpel (human, bovin oder murin) zusammen mit RASF, komplettem humanem RA-Synovium, OASF oder ohne Zugabe von Fibroblasten unter die Haut der SCID-Mäuse implantiert, um eine Destruktion des Knorpels *in vivo* analysieren zu können (Judex M et al., 2001).

#### **Vorbereitung der Implantate**

Die für Implantationsexperimente verwendeten humanen SF wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Pro Knorpelimplantat wurden ca.  $5 \times 10^5$  SF verwendet. Die Zellen wurden abtrypsiniert, bei 300 x g für 10 min zentrifugiert und mit 0,9% steriler NaCl-Lösung gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 50 µl steriler NaCl-Lösung pro Knorpel-Schwamm-Komplex aufgenommen.

Der zu implantierende humane Knorpel wurde makroskopisch auf farbliche Veränderungen und Unebenheiten untersucht. Anschließend erfolgte die Präparation des Knorpels von den Knochenplatten. Dabei müssen alle Kanten des Knorpels mit einem Skalpell geschnitten werden, um die Matrix frei zu legen und um die Knorpelinvasion quantifizieren zu können. Um einen optimalen Zustand des Knorpels sicher zu stellen, wurde dieser nachfolgend histologisch untersucht. Dabei wurde ein Knorpelstück in OCT TissueTek Einfriermedium gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden 5 µm-Gefrierschnitte angefertigt, kurz

luftgetrocknet und eine 10minütige Schnellfärbung in Hämatoxylin durchgeführt, um die Qualität der Knorpelstruktur und der Chondrozyten(-höfe) beurteilen zu können. Erschien die Knorpelstruktur und -färbung homogen, die Größe der Chondrozytenhöfe normal und waren vitale Chondrozyten vorhanden, wurde der vom Knochen präparierte Knorpel mit einem Skalpell in ca.  $1 \text{ mm}^3$  Stücke geschnitten und in zuvor eingeschnittene sterile Trägerschwämme ( $50\text{-}80 \text{ mm}^3$ ; *gelfoam absorbable gelatin sponge* oder EndoFrost Pellets) gesetzt. Die Knorpel-Schwamm-Komplexe wurden daraufhin in der vorbereiteten SF-Suspension oder als Kontrolle ohne RASF in 0,9% NaCl-Lösung getränkt.

Zur Injektion der RASF wurden  $5 \times 10^5$  RASF (z. T. adenoviral EGFP-transduziert) nach Abtrypsinieren und Waschen in  $100 \mu\text{l}$  0,9% NaCl-Lösung aufgenommen.

Vor der Implantation des bovinen Knorpels wurde die intakte Gelenkkapsel des Schultergelenks unter sterilen Bedingungen eröffnet. Der Knorpel wurde vom Gelenkkopf präpariert und in  $1 \text{ mm}^3$  Stücke geschnitten. Das weitere Verfahren entsprach dem der Vorbereitung des humanen Knorpels.

Zwei SCID-Mäuse dienten als Spender des murinen Knorpels. Die Mäuse wurden tierschutzgerecht getötet und die Gelenkköpfe der Schultern und Hüften entnommen. Da der murine Knorpel zur Separation vom Knochen zu klein war, wurde der gesamte Gelenkkopf in eine Trägermatrix gesetzt. Die Knorpeloberfläche wurde zuvor mittels eines Skalpells angeritzt, um die Knorpelmatrix freizulegen.

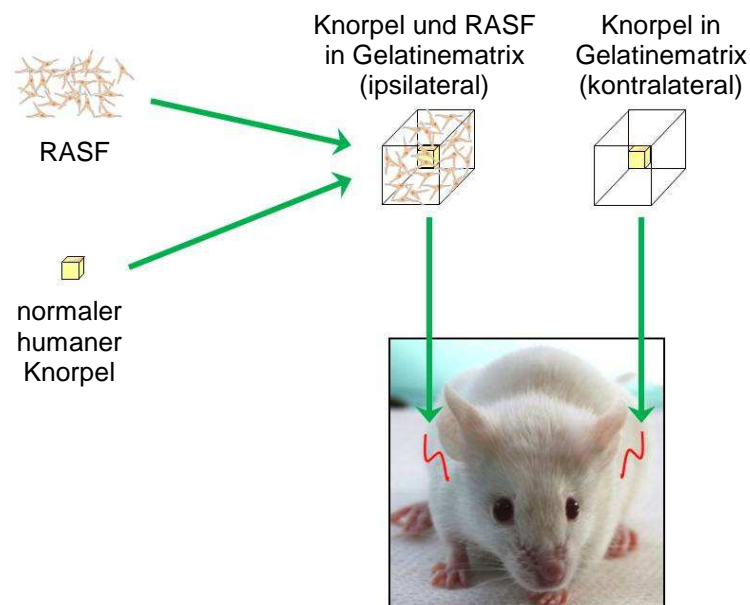
Um den Einfluß der Chondrozyten auf die RASF-Migration zu analysieren, wurde der humane Knorpel vor Implantation in die SCID-Mäuse abgetötet. Dazu wurden mehrere  $1 \text{ mm}^3$  große Knorpelstücke zweimal bei  $-80^\circ\text{C}$  für je 2 h eingefroren (Clements KM et al., 2001). Der erfolgreiche Zelltod der Chondrozyten wurde mittels Trypanblau-Färbung bestätigt. Dafür wurde ein zweimal eingefrorenes Knorpelstück für eine Minute in Trypanblau-Lösung inkubiert. Es folgte das Einbetten in OCT TissueTek und das Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Nach Anfertigung von  $5 \mu\text{m}$ -Gefrierschnitten wurden diese mikroskopisch analysiert. Die Vitalität der Chondrozyten konnte bei Blaufärbung ausgeschlossen werden.

### Ansetzen der Narkose

Zur Narkotisierung der SCID-Mäuse wurden 100 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin und 15 mg/kg KG Xylazin verwendet. Nach intraperitonealer Applikation betrug die Narkosedauer in Abhängigkeit von der individuellen Variation der Tiere 15-30 min.

### Implantation unter die Haut

Die Implantation der Knorpel-Schwamm-Komplexe wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Implantation erfolgte mittels der *inverse wrap*-Technik (Abb. 6; „klassisches Migrationsmodell“) (Judex M et al., 2001). Nach Narkotisierung der SCID-Maus wurde die Haut nach Desinfektion an einer Flanke operativ eröffnet, vom Bindegewebe abgehoben und subkutan eine Tasche präpariert. Ein Knorpel-Schwamm-SF-Komplex wurde eingesetzt (ipsilaterale Seite; I) und die Haut anschließend vernäht. Ein zweiter Knorpel-Schwamm-Komplex ohne SF wurde in die gegenüberliegende Flanke (kontralateral; Ko) implantiert (Abb. 6). Nach Vernähen der Wunde wurden die SCID-Mäuse bis zum Aufwachen auf eine Wärmeplatte gelegt und Bepanthen-Salbe auf die Augen aufgetragen, um ein Austrocknen der Augen zu verhindern. Nach Erwachen erfolgte der Transfer der Tiere in die Käfige. Eine Kontrolle der Wunden bzw. Nähte erfolgte zunächst täglich, nach ca. einer Woche 2-3 Mal wöchentlich.



**Abb. 6:** Implantationsmodell der rheumatoiden Arthritis („klassisches Migrationsmodell“). Ipsilateral wurden den Tieren in einer Gelatine-Trägermatrix RASF zusammen mit gesundem humanem Knorpel subkutan implantiert. Auf der kontralateralen Seite erfolgte das Einsetzen humanen Knorpels ohne RASF.

Als Kontrollen und zur Analyse des Einflusses der Trägermatrices auf die Migration der RASF wurden Trägerschwämme ohne humanen Knorpel, Knorpel ohne Trägerschwamm oder Knorpel mit Kunststoffpolymer-Trägermatrix (EndoFrost Pellets) statt Gelatine-Trägermatrix in zuvor beschriebener Weise implantiert.

Um die Situation eines humanen Gelenks und das Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten besser simulieren zu können, wurde statt isolierter humaner RASF auf der ipsilateralen Seite humanes komplettes Synovialgewebe als RASF-„Quelle“ zusammen mit Knorpel oder ohne Knorpel implantiert. Auf der kontralateralen Seite wurde humaner Knorpel eingesetzt. Das dafür verwendete Synovialgewebe wurde in ca. 5 mm<sup>3</sup> große Stücke geteilt und in eine Trägermatrix transferiert.

Der Einfluß der Wundheilung auf die Migration der Fibroblasten wurde analysiert, indem eine zeitversetzte Implantation der Knorpel-Schwamm-RASF-Komplexe und Knorpel-Schwamm-Komplexe erfolgte. Entweder wurde das RASF-enhaltende, ipsilaterale Implantat zuerst eingesetzt oder das RASF-freie. Nach 14 Tagen erfolgte die Implantation des entsprechend anderen Implantats.

Die Entnahme und Analyse der Implantate erfolgte jeweils nach 60-65 Tagen.

### ***Implantation unter die Nierenkapsel***

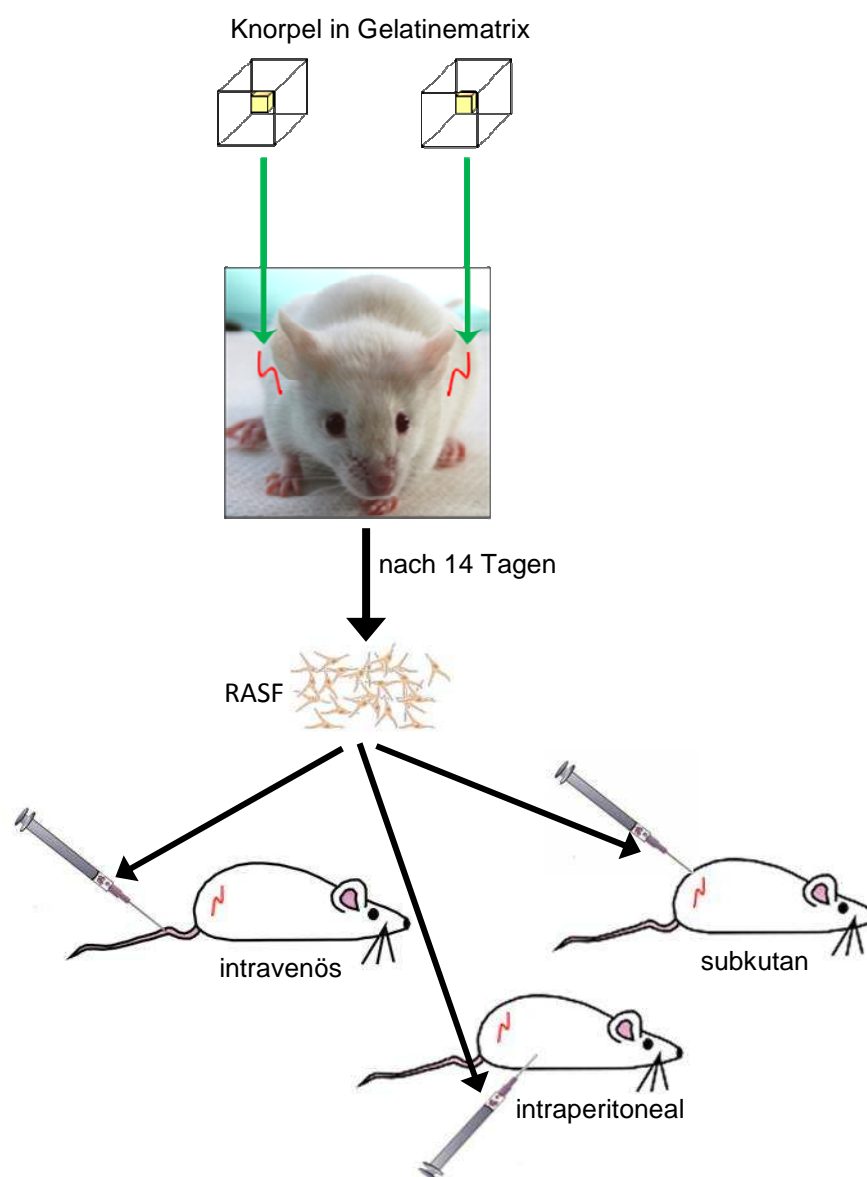
Für die Implantation des Knorpels unter die Nierenkapsel (Müller-Ladner U et al., 1996) wurde der Knorpel wie oben beschrieben vorbereitet. Der hier verwendete kleinere Gelatine-Schwamm wurde mit  $1 \times 10^5$  RASF getränkt. Nach erfolgtem Einschnitt der Haut der linken Flanke und des Bauchfells auf Höhe der Niere wurde die Niere leicht angehoben und die Nierenkapsel eröffnet. Der Knorpel sowie der RASF-Schwamm-Komplex wurden eingesetzt, die Niere und das Bauchfell an ihren ursprünglichen Platz gebracht und die Haut vernäht. Auf der gegenüberliegenden Seite wurde ein RASF-freies Knorpelimplantat subkutan implantiert. Die postoperative Versorgung erfolgte wie oben beschrieben.

### **3.3.2 Injektion der rheumatoiden synovialen Fibroblasten**

Zur Analyse des Migrationspotentials bzw. des Migrationswegs und des Einflusses des chirurgischen Eingriffs wurden die Fibroblasten in weiteren experimentellen

Ansätzen nach Implantation der RASF-freien Knorpel-Schwamm-Komplexe injiziert. Zunächst wurden die RASF-freien Implantate mittels der *inverse wrap*-Technik eingesetzt. Die Applikation der RASF erfolgte nach 14 Tagen subkutan (s.c.), intraperitoneal (i.p.) oder intravenös (i.v.) in die Schwanzvene (Abb. 7). In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen 14 Tage vor Implantation des Knorpels s.c., i.p. oder i.v. injiziert. Die Vorbereitung der Zellen erfolgte analog der Präparation der RASF für eine direkte Implantation. Das Spritzvolumen betrug (unter Beachtung des Totraumvolumens der Spritze) 100  $\mu$ l.

Die Explantation und Auswertung der Implantate erfolgte nach 60-65 Tagen.

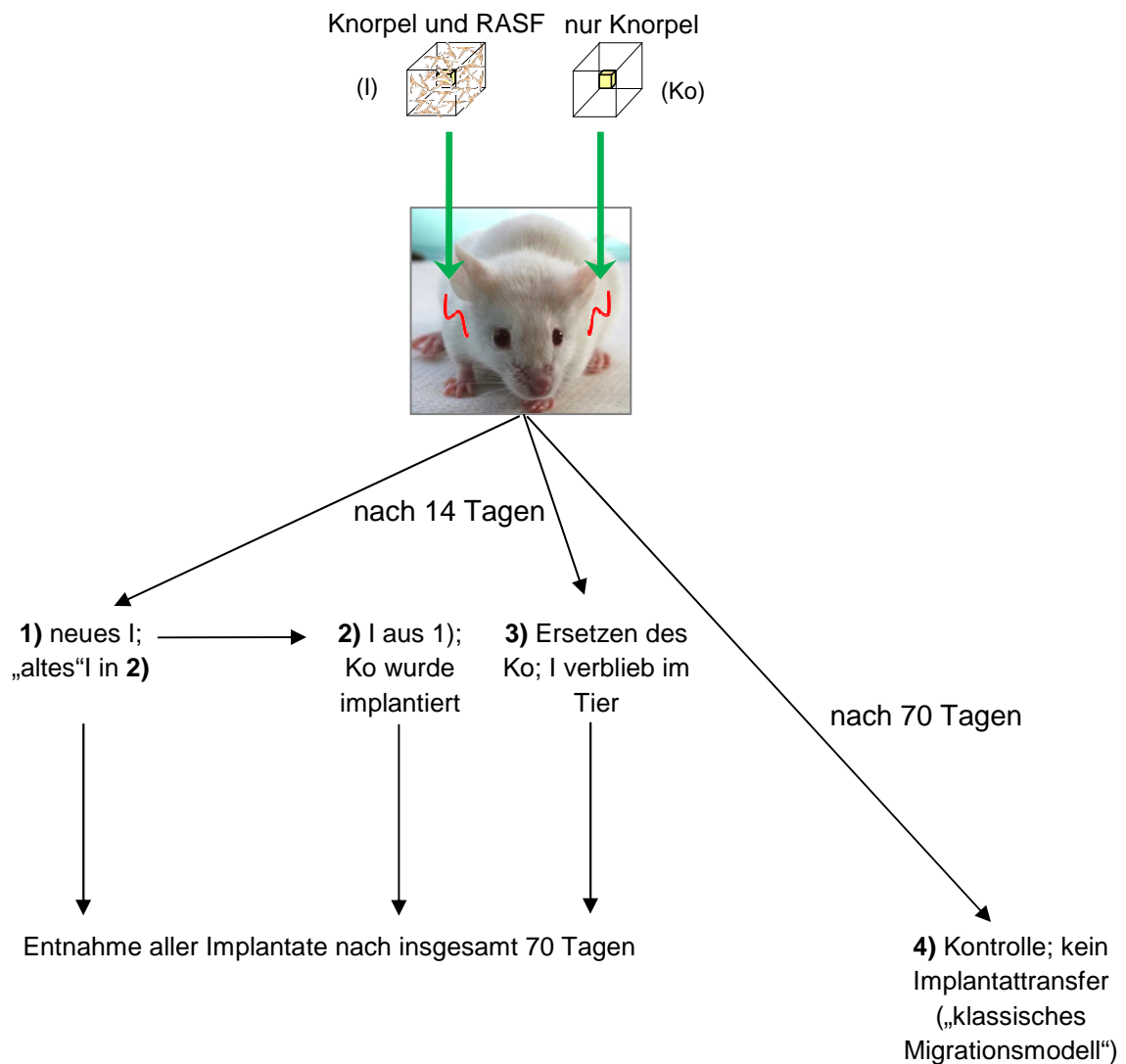


**Abb. 7:** Injektionsmodell. SCID-Mäusen wurden zunächst beidseitig Knorpel-Schwamm-Komplexe implantiert. Nach 14 Tagen folgte die Injektion der RASF i.v., i.p. oder s.c.. Alternativ wurden zuerst die RASF appliziert, nach 14 Tagen erfolgte die Implantation der Knorpel-Schwamm-Komplexe.

### 3.3.3 Zeitversetzter Implantattransfer

SCID-Mäusen wurden nach dem „klassischen Migrationsmodell“ RASF zusammen mit gesundem humanen Knorpel implantiert (ipsilateral; I). Auf der kontralateralen Seite wurde Knorpel ohne RASF (Ko) eingesetzt. Nach 14 Tagen wurden die Implantate teilweise entnommen, in neue Tiere transferiert bzw. durch neue Implantate ersetzt. Pro Gruppe wurden 5 Tiere analysiert. Die längste Gesamtdauer der Implantate im Tier betrug 70 Tage (Gruppe **1**) Ko, Gruppe **3**) I, Gruppe **4**), so dass transferierte bzw. neue Implantate mindestens 56 Tage im Tier verblieben.

Folgende Ansätze wurden durchgeführt:



**Abb. 8:** Schema des zeitversetzten Implantattransfers

### 3.3.4 Kollagenase-Injektion

Narkotisierten SCID-Mäusen wurden 50 U Kollagenase in das linke Kniegelenk injiziert (Blaney Davidson EN et al., 2007), um den murinen Gelenkknorpel für humane RASF zugänglich zu machen und damit von der Migration in geschlossene, intakte murine Gelenke abzugrenzen. Weiterhin sollte mit diesem Experiment analysiert werden, ob eine Invasion in murinen Knorpel möglich ist. Die intraartikuläre Injektion der Kollagenase unter Narkose wurde von PD Dr. Robert Dinsler durchgeführt. Anschließend wurden EGFP-transduzierte oder nicht-transduzierte RASF s.c. appliziert. Eine Implantation humanen Knorpels erfolgte in diesem Ansatz nicht. Die Mäuse wurden 28, 39 und 67 Tagen nach RASF- und Kollagenase-Applikation getötet. Die durch Kollagenase geschädigten sowie die intakten, nicht behandelten Kniegelenke wurden entnommen, für 4 Tage in 4% Formalin fixiert, in NaEDTA dekalzifiziert, in Paraffin eingebettet und nach Schneiden histologisch und immunhistologisch analysiert. Die Bearbeitung der Paraffin-Schnitte wurde freundlicherweise von Frau Carina Schreyäck durchgeführt.

### 3.3.5 Injektion der Antikörper gegen VCAM-1 und TNF $\alpha$

Um potentielle Faktoren zu analysieren, die an der Migration, Transmigration durch Blutgefäße und/oder Adhäsion der RASF beteiligt sind, wurden den SCID-Mäusen Antikörper gegen das humane VCAM-1 bzw. gegen humanes TNF $\alpha$  injiziert, um die Funktion und Wirkung dieser Moleküle zu neutralisieren. Nach Implantation der Knorpel nach dem „klassischen Migrationsmodell“ wurde der TNF $\alpha$ -Inhibitor (Adalimumab, 40 mg/kg KG, entspricht der Therapie von RA-Patienten) s.c. bzw. i.p. alle 10 bzw. 14 Tage appliziert. Anti-humanes VCAM-1 (2 mg/kg KG) wurde den SCID-Mäusen wöchentlich s.c. injiziert. Mit dieser Konzentration wurde zuvor in *in vitro*-Adhäsionsexperimenten die Reduktion der Zelladhäsion erzielt (Lefèvre S et al., 2009).

In einem Wiederholungsexperiment wurde eine 20% höhere anti-VCAM-1-Dosis den Tieren in gleicher Weise appliziert.

### 3.3.6 Effekt einzelner Matrixbestandteile auf die Migration

Sterile Kunststoffpolymer-Trägerschwämme wurden mit einzelnen Bestandteilen der EZM oder Kombinationspräparaten beschichtet, um den Einfluß von Matrixbestandteilen auf die Migration der RASF untersuchen zu können. Verwendete Komponenten der EZM waren Aggrekan, Fibronectin, Kollagen Typ II, *PuraMatrix Peptide Hydrogel*, *Matrigel Basement Membrane Matrix* sowie *Growth Factor Reduced Matrigel*. Pro Schwamm wurden 50 µl der jeweiligen Matrix(-komponente) verwendet. Dazu wurde der Trägerschwamm in der entsprechenden Matrix(-komponente) getränkt und zur Auspolymerisierung bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen belassen. Nach etwa 40 min wurde der Knorpel in die Trägerschwämme eingesetzt. Der beschichtete Komplex wurde anschließend vorsichtig, um die Matrixstruktur nicht zu zerstören, in der vorbereiteten RASF-Suspension oder 0,9% NaCl-Lösung getränkt und in eine SCID-Maus implantiert. Folgende Ansätze wurden durchgeführt:

1. Ipsilaterale Seite:        beschichteter Trägerschwamm, RASF, Knorpel  
    Kontralaterale Seite:    unbeschichteter Trägerschwamm, Knorpel
  
2. Ipsilaterale Seite:        beschichteter Trägerschwamm, RASF, Knorpel  
    Kontralaterale Seite:    beschichteter Trägerschwamm, Knorpel
  
3. Ipsilaterale Seite:        unbeschichteter Trägerschwamm, RASF, Knorpel  
    Kontralaterale Seite:    beschichteter Trägerschwamm, Knorpel

Als Kontrollen (Ansatz 4) wurden Knorpel und Zellen nach dem „klassischen Migrationsmodell“ ohne Beschichtung der Kunststoff-Trägermatrices implantiert.

### 3.3.7 Entnahme der Implantate, Organe, Gelenke und des Blutes

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die SCID-Mäuse nach 60 Tagen getötet und Knorpelimplantate, innere Organe (Niere, Milz, Darm, Leber, Lunge, Herz, Lymphknoten) sowie Haut nahe den Implantaten und zwischen diesen entnommen.

Außerdem wurden jeweils ein murines Gelenk (Zehe) und muriner Ohrknorpel analysiert. Die Implantate und Gewebe wurden nach Entnahme sofort in OCT TissueTek Einfriermedium eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Zusätzlich erfolgte unter Heparinzugabe die Entnahme des murinen Bluts aus den Nierengefäßen für nachfolgende Zytospins von Blutzellen oder zur DNA-Isolation und Serum-Analyse. Das Blut wurde bis zur Zentrifugation bei 200 x g für 10 min auf Eis belassen. Das Serum wurde bei -20°C gelagert, das Blutpellet zur DNA-Isolation sofort weiterbearbeitet oder ebenfalls bei -20°C aufbewahrt.

Die implantierten murinen Gelenkköpfe wurden nach 60 Tagen entnommen, in 4% Formalin fixiert, in NaEDTA dekalzifiziert und in Paraffin eingebettet.

Um zu prüfen, ob die Angiogenese um den implantierten Knorpel herum und in das Implantat hinein ein frühes Ereignis ist, wurden einige Implantate nach 7 bzw. 14 Tagen entnommen und histologisch analysiert.

### **3.4 Histologische und immunologische Methoden**

#### **3.4.1 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Die verschiedenen Gewebeschnitte (Synovialgewebe, Knorpelimplantate, murine Gewebe) wurden an einem Kryostat angefertigt. Die Schnittdicke betrug 5 µm, bei Schnitten für eine anschließende Laser-medierte Mikrodisektion (LMM) 8-10 µm. Die Fixierung der Schnitte erfolgte 10 min in eiskaltem Aceton oder, für die LMM, in Ethanol/5% Essigsäure. Für die LMM wurden die Gefrierschnitte unter möglichst RNase-freien Bedingungen angefertigt und auf spezielle, mit einer PEN (Polyethylenaphthalat)-Membran bespannte Objektträger aufgezogen.

Die Lagerung der fixierten Gefrierschnitte erfolgte bei -20°C für histologische und immunhistologische Analysen bzw. bei -80°C für die LMM (Lagerung maximal zwei Tage).

### 3.4.2 Dekalzifizierung und Anfertigung von Paraffinschnitten

Die mit Kollagenase behandelten murinen Kniegelenke sowie deren Kontrollen wurden nach Entnahme und Fixierung im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg weiterbearbeitet. Hier erfolgte die Dekalzifizierung, das Einbetten in Paraffin sowie z. T. das Schneiden der Gelenke aufgrund der für die geringe Größe der Gelenke besser ausgelegten Geräte. Die Schnittdicke der Präparate betrug 5 µm. Die Arbeiten in Gießen wurden freundlicherweise von Herrn Stefan Dönges durchgeführt.

### 3.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Angefertigte Gefrier- und Paraffinschnitte wurden zur histologischen Auswertung mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (HE-Färbung). Die bei -20°C gelagerten fixierten Gefrierschnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut oder es wurden kurz zuvor geschnittene, in Azeton fixierte Schnitte verwendet. Vor der HE-Färbung der murinen, in Paraffin eingebetteten Gelenke wurden die Schnitte zum Entparaffinieren zunächst 10 min bei 55°C und anschließend 2 mal 5 min in Xylol inkubiert. Es folgte die Rehydrierung mittels Inkubation in einer absteigenden Ethanolreihe (2 mal 3 min in jeweils 100%, 96%, 70% und 50% Ethanol).

Zu Beginn erfolgte eine 10minütige Inkubation der Schnitte in 0,1%iger Hämatoxylin-Lösung (Zellkernfärbung). Nach anschließendem Waschen in H<sub>2</sub>O wurden die Schnitte 10 min in 1%iger Eosin-Lösung inkubiert (Anfärbung von Plasmaproteinen). Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte zum Entwässern durch eine aufsteigende Ethanolreihe geführt (50%, 70%, 96%, 100% Ethanol für je 3-5 min). Im Anschluss erfolgte eine Klärung der entwässerten Schnitte 3 mal für 5 min in Xylol, um die Schnitte anschließend mit Eindeckmedium (Entellan) und einem Deckglas zu konservieren. Die weitere Analyse und Dokumentation erfolgte am Mikroskop.

### 3.4.4 Giemsa-Färbung

Zur histologischen Auswertung der in Paraffin eingebetteten Mausgelenke mittels Giemsa-Färbung wurden die Schnitte zunächst einige Minuten in dH<sub>2</sub>O belassen und anschließend 30 min in Giemsa-Lösung (1:5 verdünnt) inkubiert. Nach Waschen in H<sub>2</sub>O erfolgte zur Differenzierung eine kurze Inkubation in 1%iger Essigsäure. Anschließend wurden die Schnitte in Ethanol (96%, 100% für je 2-3 min) und Xylol dehydriert und mit Eindeckmedium (Entellan) und einem Deckglas bedeckt.

### 3.4.5 Histologische Auswertung der Implantate und Organe

Nach Entnahme und Lagerung der Implantate und Organe bei -80°C wurden 5 µm-Gefrierschnitte angefertigt. Jedes Implantat der Tiere wurde hinsichtlich des Invasionsgrades der RASF in den Knorpel und der perichondrozytären Degradation ausgewertet. Nach HE-Färbung und anschließender Dokumentation der Schnitte erfolgte die Evaluation der Implantate von 5 geschulten Wissenschaftlern anhand eines etablierten Scores (Müller-Ladner U et al., 1999; Neumann E et al., 2002; Knedla A et al., 2006).

#### **Invasionsscores:**

Keine oder minimale Invasion = **0**; sichtbare Invasion (zwei Zelltiefen) = **1**; Invasion (fünf Zelltiefen) = **2**; tiefe Invasion (> 10 Zelltiefen) = **3**.

**Scores für die perichondrozytäre Knorpeldegradation:** keine Degradation (scharf abgegrenzter, intakter Chondron im Vergleich zu Knorpel vor Implantation in SCID-Mäuse) = **0**; sichtbare Degradation (ein Chondronendurchmesser) = **1**; Degradation (1-2 facher Chondronendurchmesser) = **2**; starke Degradation (> zwei Chondronendurchmesser) = **3**.

### 3.4.6 Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie sollte der humane Ursprung der den Knorpel invadierenden Zellen und das Vorkommen von humanen Zellen in den murinen Organen nachgewiesen werden. Dafür wurden Gefrierschnitte der Knorpelimplantate und der murinen Organe angefertigt, in eiskaltem Aceton fixiert und nach Trocknung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert oder direkt verwendet. Nach Wässerung in PBS wurden die Schnitte 1 h mit 2% bzw. 5% Magermilchpulver/PBS, BSA, Serum (Ziege, Kaninchen; Tab. 8) oder Rotiblock in einer Kammer mit hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Tab. 5) erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h oder über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Als Isotyp-Kontrollen dienten Isotyp-übereinstimmende IgG Seren aus Maus, Kaninchen oder Ziege (Tab.8). Als zusätzliche Negativkontrolle wurden die Schnitte nicht mit primärem, sondern nur mit sekundärem Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen oder Kreuzreaktivitäten des Sekundärantikörpers auszuschließen. Desweiteren wurde eine Reagenzkontrolle (Inkubation ohne Primär- und Sekundärantikörper) mitgeführt. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte das Blocken endogener Peroxidasen, indem die Schnitte bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 30 min mit 0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Methanol behandelt wurden. Nach erneutem Waschen in PBS folgte eine Inkubation mit den verschiedenen Sekundärantikörpern (Tab. 6) für 30 - 60 min, gefolgt von der Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin für 30 min (entfällt bei der Verwendung von *Histofine*). Zur Entwicklung wurde AEC-Substrat nach Herstellerangaben (Vector Laboratories) angesetzt, auf die Schnitte gegeben und die Reaktion je nach Farbentwicklung nach 10-20 min unter mikroskopischer Beobachtung durch PBS abgestoppt. Anschließend erfolgte das Eindecken der Präparate mit Aquatex und einem Deckglas.

Vor der Immunhistochemie der murinen Gelenke wurden die Paraffin-Schnitte zunächst durch 10 min Inkubation bei  $55^{\circ}\text{C}$ , 2 mal 5 min in Xylol sowie 2 mal 3 min in jeweils 100%, 96%, 70% und 50% Ethanol entparaffiniert und rehydriert. Mittels Proteinase K in Tris pH 8 und NaEDTA pH 8 erfolgte die Demaskierung der Epitope bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 5 min. Nach Waschen der Schnitte in 0,1% Triton X-100 und PBS wurden endogene Peroxidasen in 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Methanol für 10 min geblockt. Anschließend erfolgte, nach Waschen in PBS, das Blocken unspezifischer Bindungen mittels 5% Magermilchpulver in PBS für 1 h. Die Schnitte wurden über

Nacht bei 4°C mit anti-Vimentin- bzw. anti-H-2D<sup>d</sup>-Antikörpern inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit entsprechendem *Histofine* laut Herstellerangaben. Zur Entwicklung wurde wiederum das AEC-Substrat verwendet. Die Isotyp-Kontrolle, die Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) wie auch die Positivkontrolle (RA-Synovium) wurden parallel mitgeführt. Die immunhistologischen Analysen der murinen Kniegelenke wurden freundlicherweise von Frau Carina Schreyäck durchgeführt.

### **3.4.7 Zytospin und Immunzytochemie**

Um die Präsenz der RASF im murinen Blut zu zeigen, wurde den Tieren der Injektionsserien Heparin-Vollblut am Tag der Implantentnahme entnommen. 500-800 µl Vollblut pro Tier wurden für 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und bei -20°C gelagert.

Zur Erythrozytenlyse wurde das Blutzellpellet je nach Größe in 1-2 ml Erythrozytenlyse-Puffer resuspendiert und für 2 min bei Raumtemperatur belassen. Die Reaktion wurde mit 5 ml ZKM gestoppt und die Zellen bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Es folgte eine erneute Erythrozytenlyse. Das nach nochmaliger Zentrifugation erhaltene Pellet wurde in 100 µl PBS resuspendiert. Nach Auszählen der Zellen wurden, je nach Zellmenge, einige µl (~10 µl) der Zellsuspension in 800 µl PBS verdünnt und die Suspension in den Trichter einer Zytospin-Vorrichtung gegeben. Die Zellen wurden durch Zentrifugation in einer Zytospin-Zentrifuge (Cytospin II) für 15 min bei 120 x g auf Objektträger gebracht, anschließend luftgetrocknet, in eiskaltem Aceton fixiert und bei -20°C bis zur folgenden Immunzytochemie gelagert. Die Durchführung der Immunzytochemie erfolgte analog zur Immunhistochemie.

### **3.4.8 Nachweis humaner Zellen im murinen Blut mittels FACS-Analyse**

Am Tag der Implantatentnahme wurde den Tieren Blut entnommen (~500-800 µl pro Tier). Nach Abseren und Zusammenführen der Blutzellpellets mehrerer SCID-Mäuse (n = 5) erfolgte die Erythrozytenlyse mittels Erythrozytenlyse-Puffer. Das Zellpellet

wurde nach erfolgreicher Lyse mit PBS gewaschen und die Zellen mit 60 µl 4% Paraformaldehyd 15 min bei RT fixiert. Nach anschließendem Waschen der Zellen mit PBNS folgte die Inkubation mit PBNS für 20 min bei 4°C. Der Überstand wurde nach Zentrifugation verworfen und die Zellen mit 100 µl des primären Antikörpers (anti-human Mitochondria oder anti-human MHC class I; Tab. 5) oder Isotyps 30 min bei 4°C inkubiert. Die Inkubation mit dem sekundären Cy2-konjugierten Antikörper für 30 min bei 4°C erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBNS. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen, in diesem aufgenommen und am FACS-Gerät (FACScalibur) analysiert.

Nach der Entnahme des Blutes aus SCID-Mäusen, denen EGFP-transduzierte RASF appliziert wurden, erfolgte die Analyse am FACS-Gerät direkt nach der Erythrozytenlyse und Aufnahme in FACS-Puffer.

#### **3.4.9 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Der Mehrheit der SCID-Mäuse mangelt es an funktionellen Lymphozyten. Einige Tiere können jedoch, trotz regelmäßiger standardisierter Analysen, „leaky“ sein, d. h. es besteht die Möglichkeit, dass sie eine geringe Menge funktioneller B- und/oder T-Zellen produzieren und damit ihr Gendefekt nicht vollständig ist (Bosma GC et al., 1988). Diese „leakiness“ steigt mit zunehmendem Alter an. Um die eventuell vorhandene B- oder T-Zellaktivität der SCID-Mäuse während der Versuchslaufzeit auszuschließen, wurde das murine Serum jedes Tieres mittels ELISA (R&D Systems) auf murines IL-6 und/oder TNF $\alpha$  laut Herstellerangaben untersucht.

### **3.5 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.5.1 RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation aus kultivierten Zellen erfolgte mittels des *RNeasy Mini Kits*. Bei einer Konfluenz von ca. 90% wurden nach Waschen der RASF zur Zell-Lyse 600 µl Lysepuffer mit 0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol pro 75 cm<sup>3</sup> ZKF zugegeben. Die weiteren Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers.

Nach erfolgter Laser-medierter Mikrodissektion invadierender RASF aus Gefrierschnitten wurde die RNA der Zellen mit Hilfe des *PicoPure RNA Isolation Kits* oder des *RNeasy Plus Micro Kits* laut Herstellerangaben isoliert.

Um DNA-Kontaminationen zu minimieren, erfolgte bei Verwendung des *PicoPure RNA Isolation Kits* jeweils ein mindestens 30minütiger DNase-Verdau mittels des *RNase-free DNase Sets*. Dieser Schritt entfiel bei Verwendung des *RNeasy Plus Micro Kits*.

Die isolierte RNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit Hilfe des NanoDrops.

### 3.5.2 Reverse Transkription (RT)

Das Umschreiben isolierter RNA in cDNA erfolgte unter Verwendung von 100-300 ng RNA. Nach der Inkubation der RNA für 2 min bei 70°C wurde folgender Ansatz hergestellt:

5 x AMV-Puffer	4 µl	
PCR Nucleotid-Mix	2 µl	(10 mM)
<i>Random primer</i> p(DN) <sub>6</sub>	0,5 µl	(2 µg/µl)
AMV Reverse Transkriptase	0,6 µl	(10 U/µl)
RNase Inhibitor (RNasin)	0,8 µl	(40 U/µl)
RNA	x µl	bis 300 ng
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 20µl	

Die Reaktion lief bei folgendem RT-PCR-Programm ab:

25°C	10 min	→	Bindung der Oligonukleotide an die RNA
42°C	60 min	→	Transkription der RNA in cDNA
99°C	15 min	→	Inaktivierung der AMV Reversen Transkriptase
4°C	∞		

Die synthetisierte cDNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

### 3.5.3 Differenzierung muriner und humaner Zellen mittels PCR

Nach Implantation isolierter RASF von männlichen Patienten zusammen mit Knorpel aus weiblichen Patienten nach dem „klassischen Migrationsmodell“ wurden den weiblichen SCID-Mäusen (n = 2) nach 35 Tagen Implantate und Heparin-Blut (jeweils ca. 1000 µl) entnommen. Das Blut wurde 10 min bei 200 x g „abgesert“ und das Serum bei -20°C gelagert. Die Blutpellets wurden zu sammengeführt und die DNA mittels des *QIAamp DNA Blood Midi Kits* isoliert. Eine Aufkonzentration der DNA erfolgte mit Hilfe einer Microcon-Säule nach Angaben des Herstellers.

In der anschließenden PCR-Reaktion wurden *primer* verwendet, die in der Sequenz des *sex determining region of Y (sry)*-Gens auf dem humanen Y-Chromosom binden. Als *template* wurden die aus murinem Blut isolierte DNA, 150-200 ng Kontroll-DNA oder H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> eingesetzt. Als Positivkontrolle fungierte DNA aus dem Blut männlicher, als Negativkontrollen DNA aus dem Blut weiblicher Probanden und dH<sub>2</sub>O statt DNA-*template*. In der PCR-Reaktion enthalten waren *Taq*-Mastermix und je 0,5 µM *sry-forward* und *-reverse primer* (Sequenzen s. Tab. 11). Die Amplifikation erfolgte unter Standardbedingungen in einem Thermocycler mit einer *annealing*-Temperatur von 50°C und 45 Zyklen. Da die erwartete Bande im Gel aufgrund der geringen Zahl humaner Zellen im murinen Blut nur sehr schwach zu sehen war, erfolgte eine Aufreinigung der PCR-Reaktion mittels des *PCR Purification Kits* und im Anschluß eine Nachamplifikation der ersten aufgereinigten PCR-Produkte unter den oben beschriebenen Bedingungen.

### 3.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

Im Anschluß an eine PCR wurden die DNA-Fragmente zur Kontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in horizontalen Gelen mit 0,8 - 1,5% Agarose, gelöst in TAE-Puffer und versetzt mit 1 µg/ml Ethidiumbromid. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit 2-3 µl Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente eine 100 bp DNA-Leiter (Roth, Karlsruhe). Der Gellauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V. Die Banden wurden unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und dokumentiert.

### 3.5.5 *real time*-PCR

Die quantitative *real time*-PCR wurde mittels eines LightCyclers durchgeführt. Um eine Quantifizierung aus der in cDNA umgeschriebenen RNA zu ermöglichen, wurde das *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* verwendet. Durch Bindung des in Lösung schwach fluoreszierenden Farbstoffs *SYBR Green* an die neu entstehenden DNA-Doppelstränge wird die Fluoreszenz verstärkt. Am Ende einer jeden Elongationsphase wird die Gesamtfluoreszenz in der Kapillare gemessen. Mit zunehmender Dauer der PCR, d. h. mit zunehmender Menge des doppelsträngigen PCR-Produkts, steigt die Fluoreszenz. Die Zunahme der Fluoreszenz erfolgt proportional zur Zunahme des PCR-Produkts. Bei der verwendeten Quantifizierungsmethode wird ein Referenz-Gen (hier: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; GAPDH) in einem parallelen Ansatz mitgemessen, um die relative Quantifizierung zu ermöglichen.

Die Spezifität der *primer* wurde im Anschluß an die *real time*-PCR in einer Schmelzkurvenanalyse überprüft, da *SYBR Green* unabhängig von der Sequenz an die DNA-Doppelstränge bindet und nur mit Hilfe der Schmelzkurve unspezifische Produkte ausgeschlossen werden können. Hierbei wird durch kontinuierlichen Anstieg der Temperatur (50 → 99°C) die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen. Das erwartete Produkt besitzt eine spezifische Schmelztemperatur. Hier denaturiert der Doppelstrang und durch Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs nimmt die Fluoreszenz ab. Die PCR-Produkte besitzen eine höhere Schmelztemperatur als bspw. *primer*-Dimere bzw. eine unterschiedliche Schmelztemperatur zu anderen, unspezifischen PCR-Produkten. Sollten bei der Schmelzkurvenanalyse zwei oder mehrere *peaks* zu erkennen sein, liegen unspezifische Produkte in der Reaktion vor und eine Quantifizierung wird unmöglich. Um dies zu verhindern, müssen die *real time*-PCR-Bedingungen vor der Quantifizierung optimiert werden.

#### ***Optimierung der verwendeten primer für den LightCycler***

Um eine relative Quantifizierung zu gewährleisten, mussten optimale Bedingungen für jedes verwendete *primer*-Paar (Tab. 11) eingestellt und an das Referenz-Gen angepasst werden. Da das Referenz-Gen parallel zu den zu testenden Genen amplifiziert wird, sollten die *annealing*-Temperaturen möglichst gleich sein, um die

Bildung beider PCR-Produkte zu ermöglichen. Daher wurde als Referenzgen eine Gensequenz gewählt, deren Oligonukleotide ein möglichst breites optimales  $T_a$ -Spektrum aufweisen. Desweiteren musste jeweils die ideale  $MgCl_2$ -Konzentration für die einzelnen *primer*-Paare ermittelt werden. Dies geschah zunächst mittels einer qualitativen PCR in einem Thermocycler, um die ungefähre *annealing* Temperatur zu ermitteln. Die Durchführung der Standard-PCR erfolgte unter Berücksichtigung der entsprechenden *primer* und *annealing*-Temperaturen wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben.

Zur Analyse der Effizienz im LightCycler erfolgte die Verdünnung des cDNA-*templates* (z. B. 1:2, 1:4, 1:8, 1:16). Dabei wurden verschiedene  $MgCl_2$ -Konzentrationen getestet (z.B. 2,5 mM, 3,5 mM und 4,5 mM). Die Amplifikation erfolgte nach Angaben des Herstellers (Roche). Die Verdünnungsreihe diente der Ermittlung einer Standardkurve. Anhand der durch die LightCycler Software errechneten Steigung (*slope*; lg der Konzentration vs. ct-Wert) konnte mit folgender Formel die Effizienz (E) errechnet werden:  $E = 10^{(-1/slope)}$ . Um optimale Bedingungen für eine spätere relative Quantifizierung zu gewährleisten, sollte die Effizienz bei  $2 \pm 0,05$  liegen. Unter optimalen PCR-Bedingungen erfolgt eine Verdopplung des Produkts pro Zyklus, was einer Effizienz von 2 entspricht. Weiterhin sollten die Effizienzen der zu vergleichenden Gene möglichst nahe beieinander liegen, um falsche relative Expressionsunterschiede durch Fehler, die durch ungleiche Amplifikationseffizienzen entstehen können, auszuschließen.

Nach Optimierung wurde für *primer*, die für die Quantifizierung des mittels LMM isolierten Materials verwendet werden sollten, ermittelt, ob sie in der Lage sind, auch bei sehr geringen cDNA-Konzentrationen (< 2 ng), wie es nach der LMM der Fall ist, optimal zu binden. Dazu wurde die verwendete Test-cDNA in mehreren Schritten stark verdünnt (bis zu 1:640). Erst nachdem auch hier eine ausreichende Effizienz vorlag, wurden die *primer* für die *real time*-PCR mit Material aus der LMM eingesetzt.

***real time-PCR-Ansatz***

Für einen 20 µl-Ansatz pro Kapillare wurden folgende Komponenten verwendet:

SYBR Green Mix	10 µl (1 x)
cDNA	2 µl
<i>forward primer</i>	0,5 µl (5 pmol)
<i>reverse primer</i>	0,5 µl (5 pmol)
MgCl <sub>2</sub>	x µl (2,5mM – 4,5mM)
Ad 20 µl H <sub>2</sub> O bidest	

Nach Fertigstellung der Ansätze wurden diese in die Kapillaren pipettiert und nach Verschließen in das LC-Karussell transferiert. Der Reaktionsansatz wurde nach Zentrifugation in einer LC Carousel Zentrifuge in den LightCycler transferiert und das folgende Programm gestartet:

95°C	15 min	Initiale Denaturierung	
95°C	15 sec	Denaturierung	
x °C	25 sec	<i>annealing</i>	35-55 Zyklen
72°C	30 sec	Elongation/Fluoreszenz-Messung	

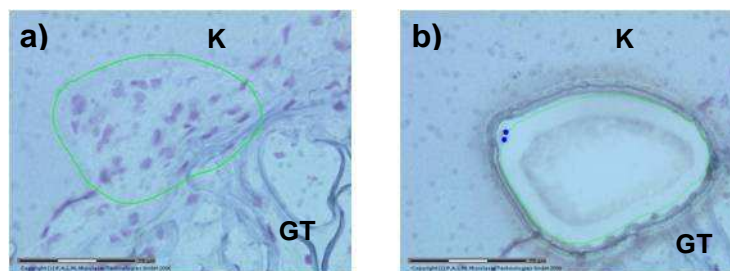
Im Anschluß an das *real time*-PCR-Programm erfolgte die Ermittlung der Schmelzkurve mittels eines kontinuierlichen Temperaturanstiegs von 50°C auf 99°C mit 0,1°C/sec. Das darauffolgende Abkühlen auf 40°C beendete den Lauf.

**3.5.6 Laser-medierte Mikrodissektion**

Mit Hilfe der Laser-medierten Mikrodissektion (LMM) und nachfolgender *real time*-PCR wurde die gezielte Genanalyse der an der Invasionszone liegenden RASF in den Knorpel ermöglicht. Dabei wurden zunächst Gefrierschnitte (8-10 µm) angefertigt, auf Objektträger, die mit einer PEN-Membran bespannt waren, aufgezogen und fixiert. Es folgte die Färbung mit RNase-freiem, sterilfiltriertem Hämatoxylin für 10-15 min. Anschließend wurden die Schnitte durch eine mit DEPC-Wasser angesetzte aufsteigende Ethanolreihe (je 2 mal 2 min 70%, 96%, 100%

Ethanol) geführt, um die Schnitte zu entwässern. Nach Trocknen bei Raumtemperatur wurde direkt weitergearbeitet oder es erfolgte die Lagerung der Schnitte bis zum weiteren Gebrauch bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für maximal zwei Tage, um die Integrität der RNA sicherzustellen.

Die LMM wurde mittels eines Mikrolaser-Systems mit gepulstem UV-Laser (Stickstoff-Laser, Wellenlänge: 337 nm; P.A.L.M. MircoBeam C) durchgeführt. Das gewünschte Areal wurde am Computer markiert (Abb. 9). Der Laser schnitt anschließend das markierte Areal aus. Durch die hohe Energiedichte am fokussierten Bereich des Laserstrahls wurden biologische Strukturen „kalt“ mittels ablativem Fotodekompositionsprozess geschnitten. Dabei entstand keine Hitze und RNA, DNA und Proteine im Randbereich werden nicht geschädigt. Anschließend wurden die isolierten Gewebeareale direkt mittels eines defokussierten Laserstrahls mit hoher Protonendichte in den Deckel eines Mikrozentrifugenröhrchens (*adhesive cap*; P.A.L.M.) katapultiert (Hashimoto A et al., 2007a; Hashimoto A et al., 2007b). Im Deckel befand sich zu diesem Zeitpunkt RNA-Extraktionspuffer, um die Degradation der RNA so gering wie möglich zu halten. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Abb. 9:** Schritte der LMM. (a) Die invadierenden RASF (grüne Markierung) werden zunächst markiert und gezählt. Anschließend erfolgt das Ausschneiden und Katapultieren des markierten Areals (b). K: Knorpel; GT: Gelatine-Trägermatrix

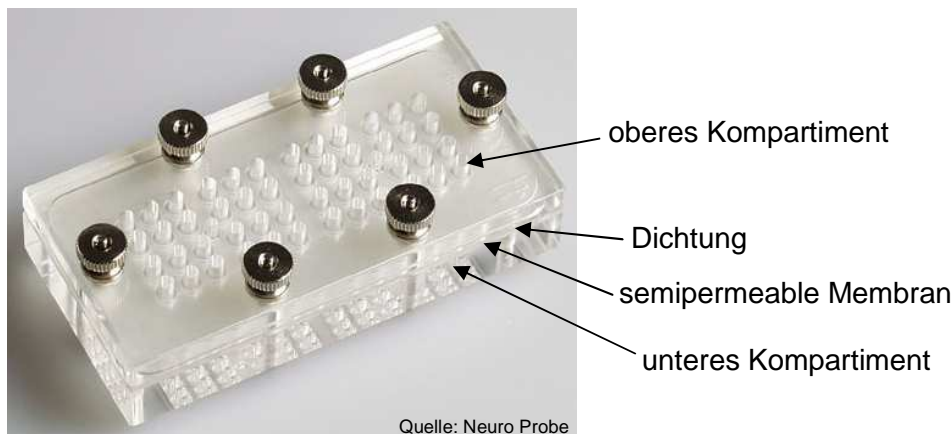
Eine ausreichende Menge RNA für die durchgeführten Analysen zu erhalten, wurden etwa 10000 RASF pro Gewebe/pro Implantat aus der Invasionszone isoliert.

### 3.6 Methoden zur zellulären Migration

#### 3.6.1 Chemotaktische Analyse in der Boyden-Kammer

Zur Analyse der gerichteten zellulären Migration (Chemotaxis) wurden Chemotaxis-Experimente in der Boyden-Kammer durchgeführt. Mittels dieses Tests können

Effekte verschiedener Substanzen in Bezug auf die gerichtete Migration von z. B. RASF untersucht werden. Ursprünglich wurde dieser Test für Leukozyten entwickelt (Boyden S, 1962), mittlerweile existieren viele modifizierte Formen für andere Zelltypen, wie z. B. für Fibroblasten. Zellen und die zu testende Substanz werden durch eine semipermeable Membran mit (je nach Zelltyp) definiertem Porendurchmesser voneinander getrennt und durchwandern diese je nach „Attraktivität“ der Testsubstanz in unterschiedlichem Maße (Abb. 10). Nach einer zuvor getesteten Migrationsdauer werden die gewanderten Zellen fixiert, gefärbt und ausgezählt.



**Abb. 10:** Boyden-Kammer. Die zu analysierenden, chemotaktisch wirksamen Substanzen befinden sich in den Vertiefungen des unteren Kompartiments der Kammer, die RASF in den oberen. Die Kompartimente sind durch eine semipermeable Membran mit einem Porendurchmesser von 8  $\mu\text{m}$  (für RASF) voneinander getrennt.

### ***Herstellung des konditionierten Mediums***

Da RASF nicht über mehrere Stunden ohne FCS kultiviert werden können, wurde konditioniertes Medium mit 2% FCS hergestellt. RASF wurden in einer 75  $\text{cm}^2$ -ZKF bis zu einer Konfluenz von 95-100% kultiviert. Nach Absaugen des Mediums und zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde frisches ZKM mit 2% FCS zugegeben. Nach 24-36 h wurde das Medium abgenommen, durch Zentrifugation evtl. vorhandene Zellen entfernt, aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### ***Analyse der Migration***

Die Analyse der gerichteten Migration der RASF wurde in der Boyden-Kammer durchgeführt. Dazu wurden RASF unter Standardbedingungen kultiviert, mittels Accutase abgelöst und nach Waschen mit PBS in konditioniertem Medium

aufgenommen. Die zu testende Substanz stellte in einem Experiment fein gemahlener humaner Knorpel dar. Dieser wurde freundlicherweise von Herrn Matthias Geyer zur Verfügung gestellt. Hierfür wurde im Rahmen von Gelenkersatzoperationen nach Entfernen nicht geschädigter Knorpelareale der Knorpel mehrmals mit 0,9% NaCl-Lösung gespült, in kleine Stücke geschnitten und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In einer Kugelmühle wurden die Knorpelstücke unter eiskalten Bedingungen gemahlen und bis zum weiteren Gebrauch bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert (Geyer M et al, 2009). Eine definierte Knorpelpulvermenge ( $10\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $50\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$  bzw.  $100\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurde in konditioniertem Medium aufgenommen und in die unteren Kompartimente der Kammer gegeben. Pro Konzentration wurden 4 parallele Ansätze durchgeführt, da durch Luftblasen oder Perforationen der Membran eine Migration der Zellen unterbunden werden kann und so nicht ausreichende Replikate für die Auswertung zur Verfügung stehen könnten. Als Positivkontrolle diente ZKM mit 10% FCS, als Negativkontrolle wurde serumfreies ZKM verwendet. Die Definition der *baseline* erfolgte mit konditioniertem Medium. Die semipermeable Membran mit einem Porendurchmesser von  $8\ \mu\text{m}$  wurde luftblasenfrei aufgebracht, Dichtung und Kammerdeckel vorsichtig aufgelegt und fixiert. In die oberen Kammern wurde die Zellsuspension (30000 RASF/Kammer) luftblasenfrei eingebracht. Es folgte eine Inkubation von 5 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 10%  $\text{CO}_2$ . Anschließend wurde der Kammerdeckel entfernt und die Oberseite der Membran vorsichtig mit Hilfe zweier Pinzetten über eine Gummilippe gezogen, um nicht migrierte, bei der späteren Auswertung störende RASF zu entfernen. Die Membran wurde mit der Oberseite nach unten auf einen Objektträger transferiert und die Zellen über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  in Methanol fixiert.

Am nächsten Tag erfolgte nach Waschen der Membran in VE-Wasser die Färbung der migrierten RASF. Die Membran wurde zunächst 15 min in Hämatoxylin inkubiert. Nach einem Waschschrift in  $\text{H}_2\text{O}$  erfolgte eine 5minütige Inkubation in May-Grünwald-Lösung. Nach erneutem Waschen wurden die migrierten Zellen für 5 min in Giemsa-Lösung gefärbt. Die Auszählung der RASF erfolgte mikroskopisch bei 200facher Vergrößerung. Pro Ansatz wurden 3 Gesichtsfelder ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

In weiteren Chemotaxis-Experimenten wurden die folgenden Substanzen bezüglich ihres Einflusses auf die Migration von RASF untersucht: Adalimumab ( $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )

und anti-VCAM-1-Antikörper (34 µg/ml). Die Durchführung erfolgte analog zu der oben beschriebenen.

### 3.6.2 *Scrape motility assay*

Zur Analyse der ungerichteten Zellmigration (Chemokinese) *in vitro* wurde ein *scrape motility assay* durchgeführt. RASF wurden bis zu 100% Konfluenz kultiviert und mit folgenden Substanzen für 1,5 h präinkubiert: anti-CCR-7-Antikörper (25 µg/ml), CCL19 (500 ng/ml), anti-CCR-7/CCL-19, Adalimumab (100 µg/ml), anti-VCAM-1-Antikörper (34 µg/ml) und Tocilizumab (136 µg/ml). ZKM mit 10% FCS diente als Positivkontrolle, konditioniertes Medium (*baseline*) und serumfreies ZKM dienten als Negativkontrollen. Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurde eine definierte Fläche im Zellrasen freigelegt und abgelöste Zellen durch Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die zu testenden Substanzen in serumfreiem ZKM erneut zu den RASF gegeben und die freigelegte Fläche fotografiert (Abb. 11). Nach 8 h Inkubation wurden alle 1,5 h Fotos derselben Stelle gemacht. Nach einer Gesamtinkubationszeit von 18 h erfolgte das Auszählen der migrierten Zellen am PC.



**Abb. 11:** Verlauf der RASF-Motilität im *scrape motility assay*. Dargestellt ist der Startzeitpunkt (t0). Nach 8 Stunden kann eine beginnende Bewegung beobachtet werden. Am Endzeitpunkt (nach 18 Stunden) war ein Schluß der freigelegten Fläche zu beobachten.

## 3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels der Student-t-Verteilung in Microsoft Excel mit einer statistischen Signifikanzgrenze bei  $p < 0,05$ .

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Migrationspotential der rheumatoiden synovialen Fibroblasten

Da die RA nicht zu den lokal begrenzten Erkrankungen gehört, sondern sich in ihrem Verlauf zunehmend und oft symmetrisch ausbreitet, wurde nach zentralen Mediatoren und Faktoren gesucht, die zur Ausbreitung beitragen, sie begünstigen und zur fortschreitenden Knorpeldestruktion führen.

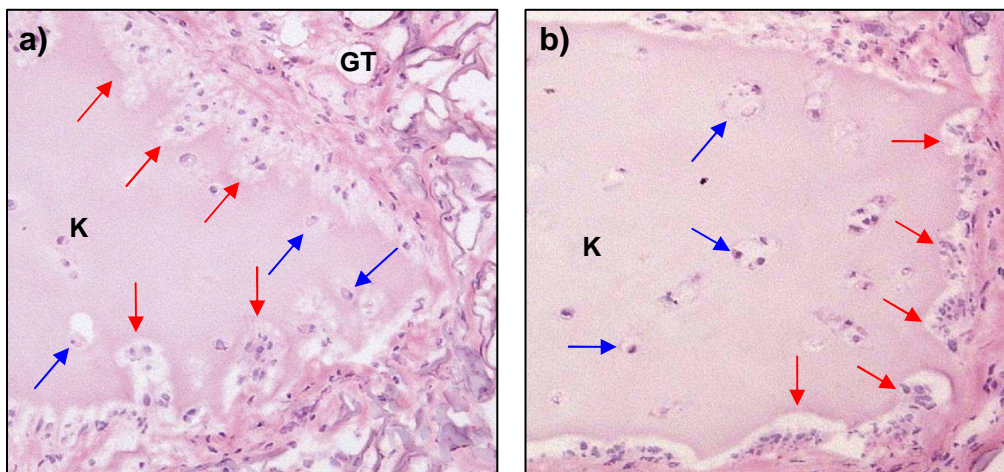
Basierend auf der Fähigkeit der RASF, aktiv humanen Knorpel zu zerstören (Müller-Ladner U et al., 1996; Neumann E et al., 2002), wurde in der vorliegenden Arbeit das Migrationspotential der RASF sowie deren Weg innerhalb eines Organismus *in vivo* analysiert.

#### 4.1.1 Analyse des Migrationspotentials

RASF sind in der Lage, über kurze Distanzen *in vitro* zu migrieren (Garcia-Vicuña R et al., 2004) und spielen eine entscheidende Rolle in der Zerstörung des humanen Gelenkknorpels. Da sich die RA in ihrem Verlauf ausbreitet, wurde die Migrationsfähigkeit der knorpeldestruierenden RASF mittels *in vivo*-Migrationsexperimenten analysiert. Mit Hilfe des SCID-Mausmodells der RA war die Analyse der Migration der RASF über weite Distanzen in einem Organismus möglich. Dazu wurde SCID-Mäusen im Bereich der Flanke subkutan Knorpel zusammen mit isolierten RASF implantiert (ipsilaterale Seite; I) und auf der gegenüberliegenden Seite Knorpel ohne RASF eingesetzt (kontralaterale Seite; Ko; „klassisches Migrationsmodell“) (s. Abb. 5). Nach 60 Tagen im Tier konnte, wie bereits in vorhergehenden Versuchen (Müller-Ladner U et al., 1996; Müller-Ladner U et al., 1997; Judex M et al., 2001; Neumann E et al., 2002), gezeigt und bestätigt werden, dass die auf der ipsilateralen Seite zusammen mit humanem Knorpel koimplantierten RASF in der Lage sind, am Knorpel zu adhären, aktiv in ihn einzuwandern und zu degradieren. Die vor der Implantation in das Tier mit einem Skalpell präparierten glatten, gut abgrenzbaren Seiten des Knorpels waren nicht mehr erkennbar. Mehrere

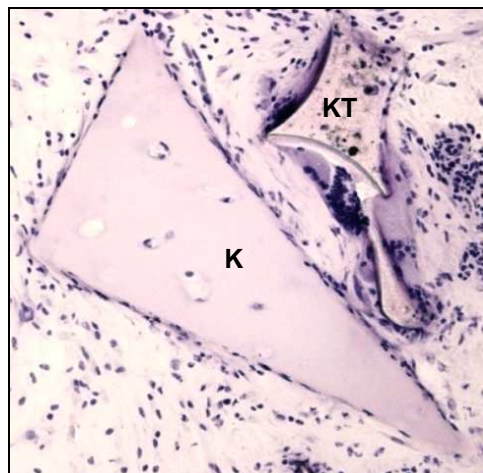
Areale mit invadierenden RASF sowie eine starke perichondrozytäre Degradation des Knorpels (Abb. 12a) konnten beobachtet werden. Dabei wurde die perichondrozytäre Degradation nicht nur an Chondrozyten nahe der einwandernden RASF gezeigt, sondern auch im Zentrum des implantierten Knorpels. Die durchschnittlichen Invasionscores (Inv) des ipsilateral implantierten Knorpels wiesen Werte von  $2,3 \pm 0,8$  (Abb. 14), die durchschnittlichen Degradationsscores (Deg) Werte von  $1,8 \pm 0,8$  auf.

Interessanterweise waren die auf der ipsilateralen Seite der SCID-Mäuse implantierten RASF nicht nur in der Lage, den mit ihnen koimplantierten Knorpel zu invadieren und degradieren. Sie verließen ihren Implantationsort und migrierten innerhalb des Versuchszeitraums durch den murinen Organismus zum kontralateral, ohne RASF implantierten Knorpel und adhärten an diesem. Dabei behielten die humanen Zellen über diese Distanz ihr aggressives invasives und degradierendes Verhalten bei (Abb. 12b). Es konnten auch hier tiefe Invasionen der RASF in den kontralateral implantierten Knorpel sowie perichondrozytäre Degradationen beobachtet werden. Die ermittelten Scores lagen mit  $1,9 \pm 0,9$  (Inv; Abb. 14) und  $1,6 \pm 0,6$  (Deg) nur leicht unter denen des zusammen mit RASF implantierten Knorpels und zeigten keinen signifikanten Unterschied.



**Abb. 12:** Histologische Darstellung der Migration und Einwanderung der RASF in den Knorpel. Isolierte RASF besitzen die Fähigkeit, am koimplantierten humanen Knorpel zu adhären, in ihn einzuwandern und zu degradieren (a, ipsilateraler Knorpel; rote Pfeile: Invasion; blaue Pfeile: perichondrozytäre Degradation). RASF sind in der Lage, durch den murinen Organismus zu entfernt implantiertem Knorpel zu migrieren und auch diesen zu zerstören (b, kontralaterale Seite). Sie behalten nach der Migration ihr aggressives invasives Verhalten bei. HE-Färbung; K: Knorpel; GT: Gelatine-Trägermatrix

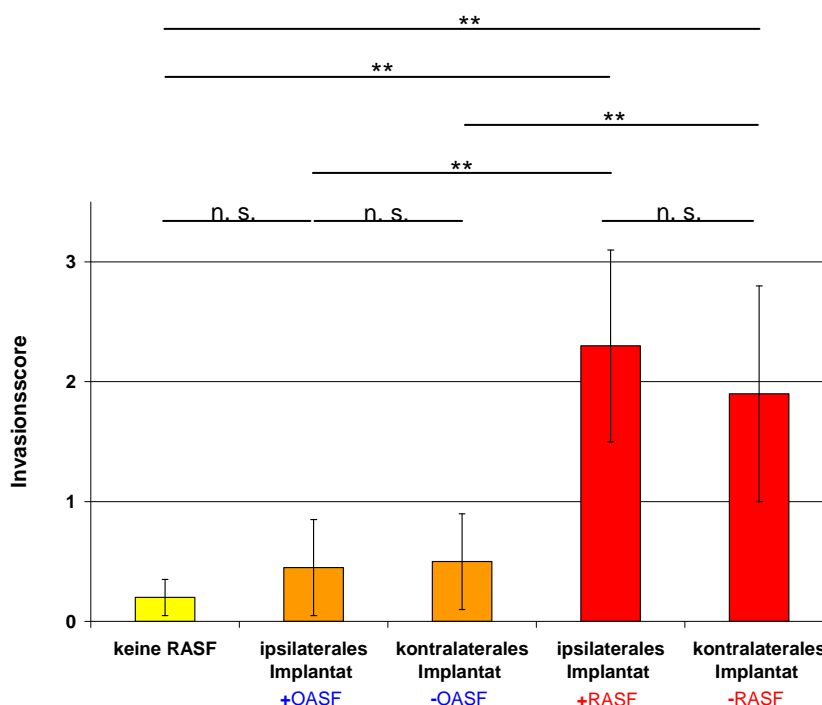
Nur RASF zeigten, im Gegensatz zu anderen Fibroblasten, dieses aggressive, den Knorpel zerstörende Verhalten. Dies wurde dadurch demonstriert, indem als Kontrolle SF aus Patienten mit OA anstelle von RASF zusammen mit humanem Knorpel in SCID-Mäuse implantiert wurden. Es konnte kein invasives knorpeldegradierendes Verhalten der OASF nachgewiesen werden, weder auf der ipsilateralen noch auf der kontralateralen Seite (Abb. 13).



**Abb. 13:** Histologie des mit OASF koimplantierten humanen Knorpels. Nach 60 Tagen im Tier konnte keine Einwanderung in den Knorpel und nur eine geringe perichondrozytäre Degradation des Knorpels gezeigt werden. HE-Färbung; K: Knorpel, KT: Kunststoff-Trägermatrix

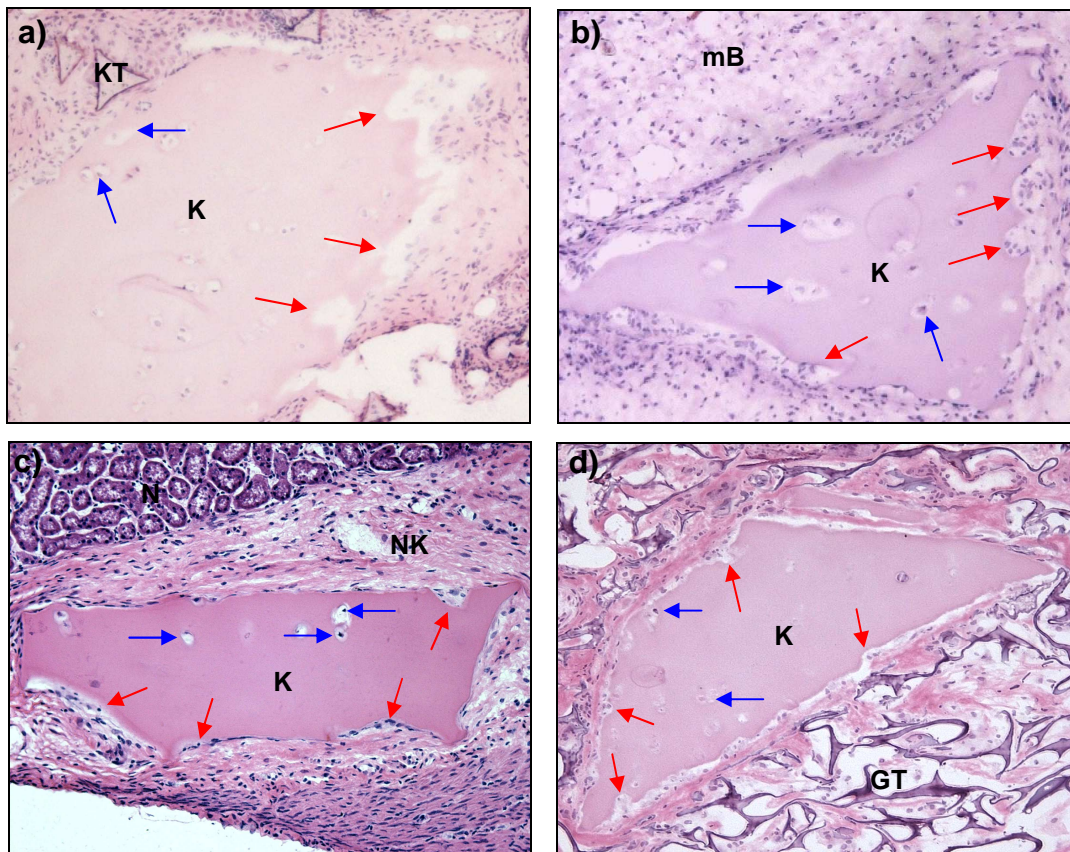
Die Scores des auf der ipsilateralen Seite mit OASF koimplantierten Knorpels wiesen Werte von  $0,5 \pm 0,3$  (Inv) und  $0,9 \pm 0,4$  (Deg) auf, der auf der kontralateralen Seite eingesetzte Knorpel  $0,5 \pm 0,4$  (Inv) und  $0,9 \pm 0,4$  (Deg) (Abb. 14).

Als zusätzliche Kontrolle und um Interaktionen der murinen Zellen mit humanem Knorpel auszuschließen, wurde Knorpel in die Mäuse implantiert, ohne humane Zellen zuzugeben. In den beidseits eingesetzten zellfreien Knorpelimplantaten konnte nach 60 Tagen kein Knorpelabbau nachgewiesen werden (Inv:  $0,2 \pm 0,15$ ; Deg:  $0,1 \pm 0,07$ ) (Abb. 14).



**Abb. 14:** Gegenüberstellung der Invasionsscores nach Knorpelimplantation und Applikation von RASF, OASF bzw. ohne humane Zellen. Bei direkter Koimplantation mit RASF konnte im ipsilateralen Knorpelimplantat eine starke Invasion durch RASF gezeigt werden. Die Invasion in den kontralateral eingesetzten Knorpel war nur leicht reduziert. Die Implantation von OASF bzw. ohne Zugabe humaner Zellen zeigte einen nur sehr geringen bzw. keinen Abbau des Knorpels. \*\*  $p < 0,001$ ; n.s.: nicht signifikant

Um einen möglichen Einfluss der Gelatine-Trägermatrix auf die Migration der RASF auszuschließen, wurde der Knorpel zusammen mit einem Kunststoff-Trägerschwamm statt des Gelatine-Schwamms nach dem „klassischen Migrationsmodell“ implantiert. Weiterhin erfolgte das Einsetzen humaner Knorpels ohne eine umgebende Trägermatrix auf der kontralateralen Seite. In weiteren Experimenten wurde den Tieren alternativ humaner Knorpel unter die Nierenkapsel und auf der gegenüberliegenden Seite Knorpel subkutan implantiert. Auch hier konnte in allen Fällen die Migration zum und vor allem die Einwanderung der RASF in den Knorpel gezeigt werden (Abb. 15). Die beobachtete Zerstörung des Knorpels unterschied sich in ihrer Intensität nicht von der der in Gelatine-Trägermatrix eingebetteten Knorpel (Abb. 12, 15).

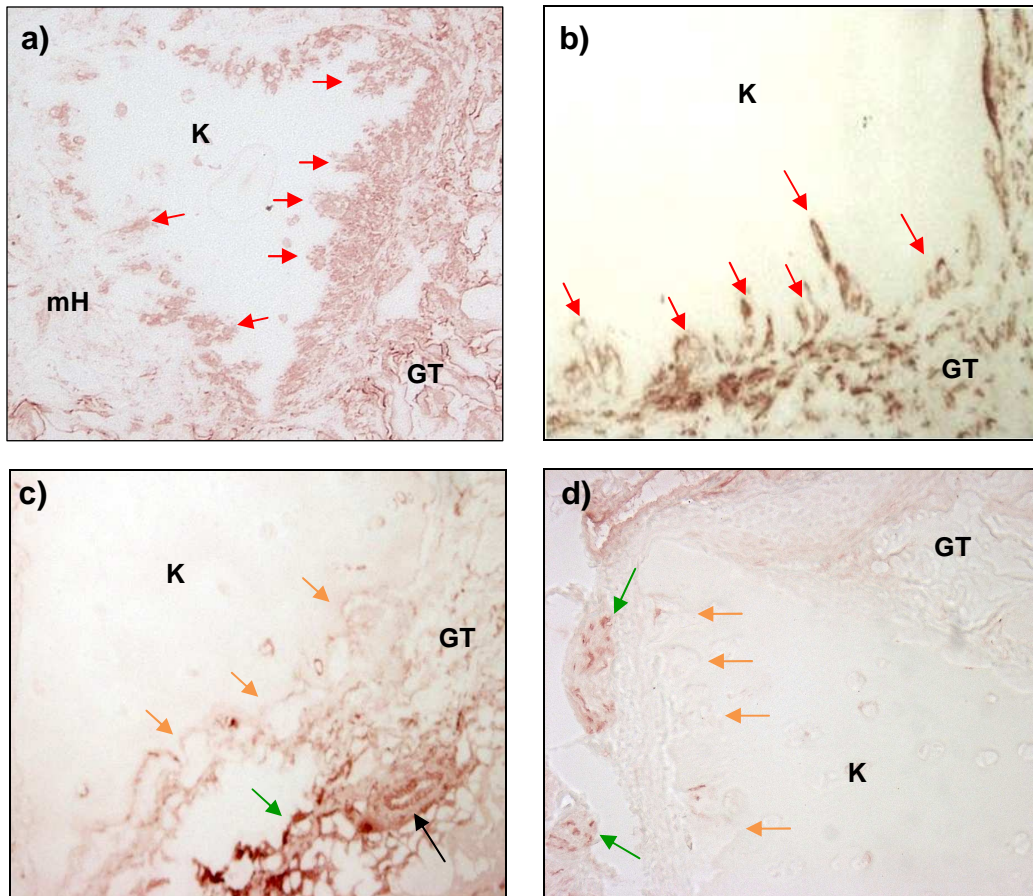


**Abb. 15:** Implantation des Knorpels mit Kunststoff- bzw. ohne Trägermatrix sowie unter die Nierenkapsel. Um einen Einfluß der Gelatine-Trägermatrix auf die Migration der RASF auszuschließen, wurde Knorpel zusammen mit einer Kunststoff-Trägermatrix (a) bzw. Knorpel ohne Trägermatrix (b) in SCID-Mäuse implantiert. In beiden Fällen konnte kein Unterschied bezüglich der Knorpelinvasion (rote Pfeile) und perichondrozytären Degradation (blaue Pfeile) im Vergleich zu in Gelatine-Trägermatrices eingebetteten Knorpelstücke beobachtet werden. Auch die Implantation des Knorpels unter die Nierenkapsel führte zur zuvor beobachteten Zerstörung des Knorpels (c) sowie der Migration zum kontralateral subkutan implantierten Knorpel (d). HE-Färbung; GT: Gelatine-Trägermatrix; K: Knorpel; KT: Kunststoff-Trägermatrix; mB: murines Bindegewebe; N: Niere; NK: Nierenkapsel

#### 4.1.2 Nachweis des humanen Ursprungs der invadierenden Zellen

Der Nachweis des humanen Ursprungs der Knorpel-einwandernden Zellen erfolgte sowohl am ipsi- als auch am kontralateralen Implantat mittels immunohistochemischer Färbungen. Es wurden dafür zuvor auf verschiedenen humanen und murinen Geweben getestete, speziesspezifische Antikörper verwendet. Die den Knorpel invadierenden Zellen wiesen eine positive Färbung für anti-humane Antikörper gegen Vimentin, Follistatin (Abb. 16a, b) und proMMP-13 auf. Dagegen konnten Antigene

des murinen IL-1-Rezeptors sowie des H-2D<sup>d</sup> (muriner MHC-Komplex) an der Invasionszone nicht detektiert werden (Abb. 16c, d). Allerdings wurden durch die anti-murinen Antikörper die das Knorpelimplantat umgebende murine Haut bzw. Bindegewebe sowie murine Gefäße angefärbt (Abb. 16c, d).



**Abb. 16:** Nachweis des humanen Ursprungs der den Knorpel invadierenden Zellen. In a) und b) sind immunhistochemische Färbungen mit anti-humanen Vimentin- (a) bzw. anti-humanen Follistatin-Antikörpern (b) dargestellt. Die den Knorpel (K) invadierenden humanen Zellen sind deutlich zu erkennen (rote Pfeile), die murine Haut (mH) wurde dagegen nicht angefärbt. In c) ist die Immunhistochemie mit anti-murinen H-2D<sup>d</sup>- und in d) mit anti-murinen IL-1-Rezeptor-Antikörpern dargestellt. Murine Gefäße (schwarzer Pfeil) sowie murine Haut (grüne Pfeile) wurden nachgewiesen. Knorpel-einwandernde Zellen an der Invasionszone (orangene Pfeile) konnten mittels anti-muriner Antikörper nicht gezeigt werden. GT: Gelatine-Trägermatrix

#### 4.1.3 Zeitversetzte Implantation

Das ipsilaterale (RASf-enthaltende) und das zellfreie kontralaterale Knorpelimplantat wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die SCID-Mäuse eingebracht, um den

Einfluss des chirurgischen Eingriffs und der Wundheilung bzw. der Neoangiogenese im Hinblick auf die Migration zu analysieren.

Zunächst wurde das ipsilaterale Knorpelimplantat eingesetzt. Nach 14 Tagen folgte die Implantation des RASF-freien Knorpel-Schwamm-Komplexes. Die Scores des mit Fibroblasten koimplantierten Implantats nach Entnahme und histologischer Analyse zeigten Werte von  $2,7 \pm 0,4$  (Inv) und  $2,5 \pm 0,7$  (Deg), die des kontralateralen Implantats  $1,5 \pm 0,6$  (Inv) und  $1,7 \pm 0,8$  (Deg). Damit waren die Invasionscores des ipsilateralen Implantats signifikant höher als die des kontralateral implantierten Knorpels ( $p < 0,001$ ).

In einem weiteren Ansatz wurde zunächst der zellfreie, kontralaterale Komplex eingesetzt, gefolgt von der Implantation des RASF-enthaltenden Implantats 14 Tage später. Die Scores der zellfreien Implantate lagen bei  $2,8 \pm 0,5$  (Inv) und  $2,5 \pm 0,7$  (Deg), die der RASF enthaltenden bei  $1,8 \pm 0,7$  (Inv) und  $2,3 \pm 0,7$  (Deg). Die Invasionscores des kontralateral implantierten Knorpels waren signifikant höher als die des ipsilateralen Implantats ( $p < 0,001$ ).

In beiden Ansätzen war die Einwanderung der RASF in den zuerst implantierten Knorpel stärker als in den nachfolgend eingesetzten Knorpel. Dabei spielte es keine Rolle, ob das Knorpelstück mit oder ohne RASF implantiert wurde.

#### **4.1.4 Injektion der rheumatoiden synovialen Fibroblasten**

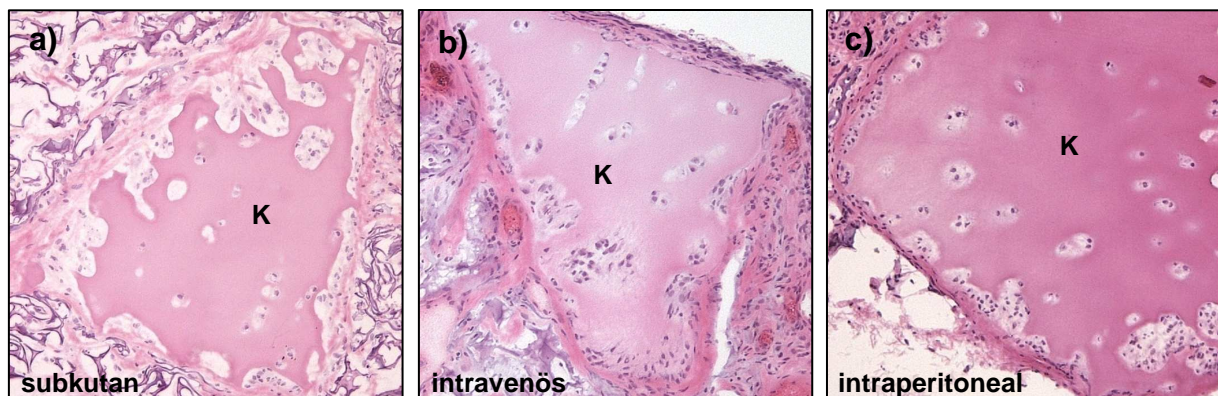
Um Hinweise zum Weg der Migration der RASF bzw. weitere Hinweise zum Einfluss der Wundheilung auf die Migration zu bekommen, wurden die Zellen nicht mit Knorpel koimplantiert, sondern zeitversetzt in die Tiere injiziert.

Zunächst erfolgte die beidseitige Implantation der RASF-freien Knorpel-Schwamm-Komplexe. Nach 14 Tagen, d. h. nach fortgeschrittener und teilweise abgeschlossener Wundheilung, wurden den SCID-Mäusen RASF s.c., i.p. oder i.v. injiziert.

Eine starke Zerstörung des implantierten Knorpels, die mit der zeitgleichen Implantation der Zellen und des Knorpels („klassisches Migrationsmodell“) etwa gleichzusetzen war, konnte 60 Tage nach Injektion beobachtet werden. Dabei erfolgte die Migration zum und Einwanderung in den Knorpel unabhängig von der Applikationsart. Allerdings waren Unterschiede im Ausmaß der Invasion und

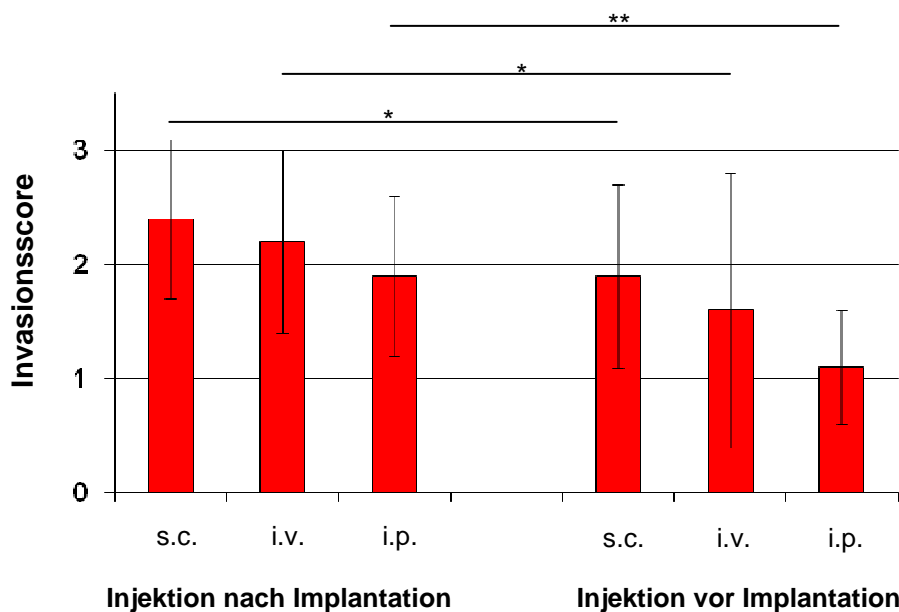
perichondrozytären Degradation zu beobachten. Im Mittel erfolgte der stärkste Abbau des Knorpels nach s.c. Applikation der Zellen (Inv:  $2,4 \pm 0,7$ ; Deg:  $2,1 \pm 0,7$ ; Abb. 17a, 18). Die stärkste Invasion in einzelne Knorpelimplantate konnte nach i.v. Applikation beobachtet werden (Inv:  $2,2 \pm 0,8$ ; Deg:  $2,0 \pm 0,8$ ; Abb. 17b, 18). Erstaunlicherweise waren eine Invasion und Degradation des Knorpels auch nach i.p. Injektion der RASF zu beobachten (Inv:  $1,9 \pm 0,7$ ; Deg:  $1,8 \pm 0,7$ , Abb. 17c, 18).

Zwischen den beschriebenen Versuchsansätzen bzw. zur Kontrolle lag kein signifikanter Unterschied vor und konnte mit den Ergebnissen der Implantation nach dem „klassischen Migrationsmodell“ gleich gesetzt werden.



**Abb. 17:** Darstellung der Einwanderung in den Knorpel nach intravenöser, subkutaner und intraperitonealer Injektion der isolierten RASF. Die stärksten Invasionsscores wurden nach s.c. (a) und i.v. (b) Applikation der Zellen ermittelt. Aber auch nach i.p. Injektion (c) konnte die Zerstörung des Knorpels (K) beobachtet werden. HE-Färbung

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die RASF 14 Tagen vor Implantation des Knorpels s.c., i.p. oder i.v. injiziert. Auch nach diesem Zeitraum im Tier waren die RASF in der Lage, in nachfolgend implantierten Knorpel einzuwandern und zu degradieren. Allerdings war die Invasion in den Knorpel insgesamt schwächer als bei der der Implantation des Knorpels nachfolgenden Applikation der Zellen in die Tiere. Der Abbau des Knorpels war jedoch auch hier nach s.c. Applikation der RASF am stärksten (Inv:  $1,9 \pm 0,8$ ; Deg:  $1,8 \pm 0,8$ ; Abb. 18) gefolgt von der Invasion nach i.v. Zellzugabe, wobei hier eine stärkere Knorpeldegradation zu beobachten war (Inv:  $1,6 \pm 0,2$ ; Deg:  $2,0 \pm 0,7$ ; Abb. 18). Nach i.p. Injektion wurden wiederum die niedrigsten Scores ermittelt ( $1,1 \pm 0,5$ ; Deg:  $1,3 \pm 0,3$ ; Abb. 18).



**Abb. 18:** Gegenüberstellung der Invasionsscores nach Injektion der RASF. Die stärkste Invasion der RASF in den Knorpel war nach s.c. Injektion erkennbar, gefolgt von der Invasion nach i.v. Applikation. Allerdings waren die RASF auch in der Lage, nach i.p. Injektion das Peritoneum zu verlassen und zum implantierten Knorpel zu migrieren. Die Invasionsscores waren bei Applikation der RASF vor Implantation des Knorpels insgesamt niedriger als bei der Injektion nach Einsetzen des Knorpels, die Reihenfolge der Invasionsstärke änderte sich jedoch nicht. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; n.s.: nicht signifikant

#### 4.1.5 Implantattransfer nach 14 Tagen

Um einen Eindruck zu bekommen, ab bzw. bis zu welchem Zeitpunkt die Migration der RASF von ihrem Implantationsort aus zu entfernt implantiertem Knorpel stattfindet und ob alle RASF zur Migration in der Lage sind, wurden die Knorpelimplantate nach 14 Tagen ersetzt bzw. in neue Tiere eingesetzt (Abb. 8). Einer Tiergruppe (Gr. 1) wurde nach 14 Tagen der mit RASF implantierte (ipsilaterale, I) Knorpel entnommen und in ein neues Tier (Gr. 2) eingebracht. Diesem wurde außerdem ein RASF-freies kontralaterales (Ko) Knorpelstück implantiert. Tieren, welchen das ipsilaterale Knorpelimplantat entnommen wurde (Gr. 1), wurde ein neues RASF-enthaltendes Knorpelimplantat eingesetzt. Einer weiteren SCID-Maus-Gruppe (Gr. 3) wurde das kontralaterale Implantat nach 14 Tagen entfernt und eingefroren und ein neues RASF-freies Knorpelimplantat eingesetzt. 56 Tage nach dem Wechsel erfolgte die Entnahme und Auswertung aller Implantate.

Bei der Kontrollgruppe (Gr. 4) zeigten sich nach Ende der Versuchsdauer eine gut sichtbare Invasion und Degradation des Knorpels (I Inv:  $2,3 \pm 0,5$  Deg:  $1,5 \pm 0,5$ ; Ko Inv:  $1,8 \pm 0,9$  Deg:  $1,5 \pm 0,5$ ). Wurde das ipsilaterale Implantat nach 14 Tagen in ein neues Tier transferiert (Gr.2), erfolgte keine sichtbare Zerstörung des kontralateral implantierten Knorpels (I Inv:  $2,6 \pm 0,5$  Deg:  $1,8 \pm 0,4$ ; Ko Inv:  $0,3 \pm 0,3$  Deg:  $1,0 \pm 0,5$ ). Nach Austausch des kontralateralen Implantats (Gr.3) erfolgte der Abbau des neuen, zellfrei implantierten Knorpels (I Inv:  $2,3 \pm 0,3$  Deg:  $1,5 \pm 0,8$ ; Ko Inv:  $1,5 \pm 0,5$  Deg:  $0,9 \pm 0,3$ ). Die nach 14 Tagen entnommenen kontralateralen Implantate der Gruppe 3 wiesen zu diesem Zeitpunkt noch keine Invasion und Degradation auf. Nach Einsetzen eines neuen, RASF-enthaltenden Knorpelstücks nach 14 Tagen erfolgte eine etwa gleich starke Invasion beider implantierter Knorpel (Gr. 1: I Inv:  $2,2 \pm 0,5$  Deg:  $1,3 \pm 0,4$ ; Ko Inv:  $2,0 \pm 0,4$  Deg:  $1,2 \pm 0,5$ ). Zum besseren Vergleich sind die Invasions- und Degradationswerte der verschiedenen Knorpelimplantate in Tab. 14 zusammengefasst dargestellt.

**Tab. 14:** Ergebnis des Implantattransferexperiments. Zusammenfassung der Implantations- und Degradationswerte. P-Werte sind im Vergleich zur Kontrolle angegeben.

Gruppe	Implantat	Invasion	Degradation	p-Werte
1: nach 14 Tagen neues I Implantat, das Ko Implantat verblieb im Tier	ipsilateral	$2,2 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,4$	n.s. (0,56)
	kontralateral	$2,0 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,5$	n.s. (0,24)
2: I Implantat aus Gr. 1, neues Ko Implantat	ipsilateral	$2,6 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,4$	n.s. (0,08)
	kontralateral	$0,3 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,5$	< 0,001
3: I Implantat verblieb im Tier, neues Ko Implantat nach 14 Tagen	ipsilateral	$2,3 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,8$	n.s. (0,57)
	kontralateral	$1,5 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,3$	n.s. (0,41)
4: Kontrolle („klassisches Migrationsmodell“)	ipsilateral	$2,3 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,5$	-
	kontralateral	$1,8 \pm 0,9$	$1,5 \pm 0,5$	-

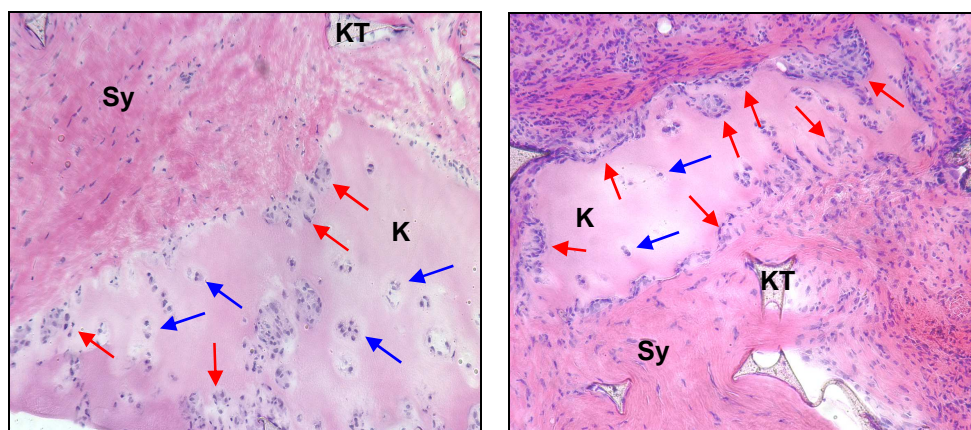
I: ipsilateral (RASF-enthaltend), Ko: kontralateral (RASF-frei); n.s.: nicht signifikant

Die Ergebnisse zeigen, dass die (Haupt-) Migration der RASF in den ersten 14 Tagen nach Knorpel-/RASF-Implantation stattfindet (s. Gr. 2). Anschließend wird der Knorpel weiterhin zerstört, eine Migration scheint jedoch kaum noch zu erfolgen.

#### 4.1.6 Migration aus humanem Synovium

Die Faktoren, die die Migration der RASF beeinflussen, sind bisher unbekannt. Um zu ermitteln, ob das natürliche Umfeld inklusive aller synovialen Zellen, der EZM sowie des Zytokinmilieus eine Migration der RASF aus ihrer eigentlichen Umgebung heraus verhindert, wurde komplettes humanes RA-Synovium als natürliche „Quelle“ der RASF mit oder ohne Knorpel auf eine Seite der SCID-Mäuse implantiert. Auf der kontralateralen Seite wurde ein Fibroblasten-freier Knorpel-Schwamm-Komplex eingesetzt. Dieser Versuchsaufbau wurde gewählt, um einen möglichen hemmenden Einfluss der Matrixadhäsion und verschiedener Chemokine oder Zytokine auf die Migration der RASF zu analysieren.

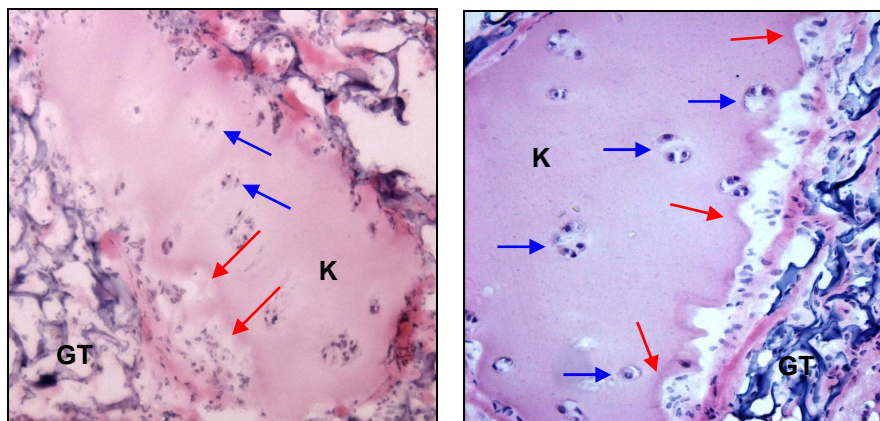
Die Implantation des humanen RA-Synoviums zusammen mit humanem Knorpel auf der ipsilateralen Seite zeigte nach 60 Tagen im Tier die Anlagerung des synovialen Gewebes an den koimplantierten Knorpel (Abb. 19). Nach Adhäsion an die Knorpelmatrix erfolgte die Invasion und der Abbau des Knorpels durch die sich im Synovium befindlichen und auswandernden RASF.



**Abb. 19:** Implantation kompletten RA-Synoviums zusammen mit humanem Knorpel. Die Anlagerung des Synoviums an den Knorpel sowie das Einwandern der synovialen Zellen (rote Pfeile) sind deutlich zu erkennen. HE-Färbung; blaue Pfeile: perichondrozytäre Degradation; K: Knorpel; KT: Kunststoff-Trägermatrix; Sy: RA-Synovium

Weiterhin resultierte die Implantation kompletten RA-Synoviums in der Migration der RASF aus dem Synovium heraus und nachfolgend in der Invasion des entfernt implantierten Knorpels, obwohl die Zahl der RASF im Synovium aufgrund der limitierten Größe des implantierten Gewebes geringer war als bei Applikation isolierter RASF. Allerdings konnte die Knorpelzerstörung nicht in allen, sondern in 9 von 15 Tieren (60 %) beobachtet werden. Wurde der Knorpel jedoch abgebaut, dann

waren die entsprechenden Scores relativ hoch. Dies betraf sowohl die Invasion (Inv:  $2,3 \pm 0,8$ ) als auch die perichondrozytäre Degradation ( $2,0 \pm 0,5$ ) (Abb. 20).



**Abb. 20:** Darstellung des kontralateral implantierten Knorpels bei ipsilateraler Implantation von humanem RA-Synovium statt isolierter RASF. RASF sind in der Lage, ihre gewohnte Umgebung zu verlassen, um zu entfernt implantiertem Knorpel (K) zu migrieren. Das Einwandern in den Knorpel konnte trotz der im Synovium reduzierten Fibroblastenzahl beobachtet werden (rote Pfeile). HE-Färbung; blaue Pfeile: Degradation; GT: Gelatine-Trägermatrix

## 4.2 Einfluss des Knorpels

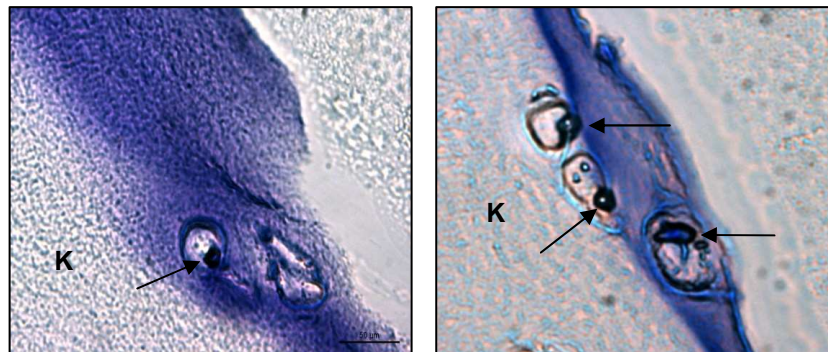
Der Knorpel als Ziel der RASF-Migration stand im Focus der folgenden Experimente. Um einen Einblick zu bekommen, welche Faktoren die Migration begünstigen oder fördern, wurden der Einfluss der Chondrozyten, des Spezies-Hintergrunds des Knorpels und der freiliegenden Knorpelmatrix bzw. verschiedener Bestandteile der EZM genauer analysiert.

### 4.2.1 Einfluss der Chondrozyten auf die Migration

Die Rolle der Chondrozyten bei der Migration der RASF sowie der Adhäsion an und Invasion in den Knorpel wurde im nächsten Schritt untersucht. Dabei sollte eruiert werden, ob die von Chondrozyten sezernierten Zytokine, Chemokine oder anderen Faktoren einen Einfluss auf die RASF-Migration ausüben.

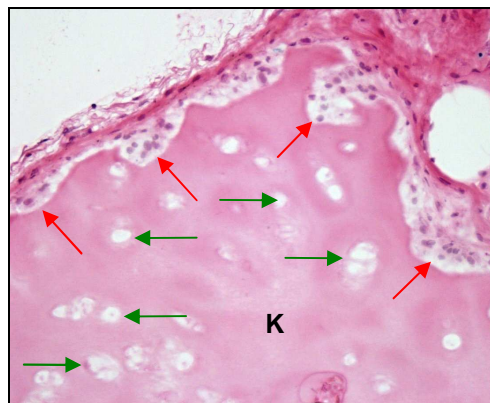
Vor Implantation des Knorpels in die SCID-Mäuse wurden die enthaltenen Chondrozyten durch mehrmaliges Einfrieren nachweislich abgetötet (Clements KM et al., 2001) (Abb. 21). Da Trypanblau zum Nachweis der abgetöteten Chondrozyten

aufgrund der Größe des Knorpelstücks nicht bis in das Innere des Knorpels vordringen konnte, wurden nur die am Rand lokalisierten Chondrozyten angefärbt. Die Diffusionstiefe des Trypanblaus war an der Blaufärbung der Knorpelmatrix erkennbar. In tote Zellen dringt aufgrund der geschädigten Zellmembran der Farbstoff ein.



**Abb. 21:** Knorpel nach zweimaligem Einfrieren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für jeweils 2 h. Die Chondrozyten wurden mit Hilfe dieser Methode abgetötet. Der Nachweis erfolgte mittels Trypanblau-Färbung. K: Knorpel; schwarze Pfeile: abgetötete, angefärbte Chondrozyten

Auch im Chondrozyten-depletierten, nicht vitalen Knorpel fand ein Einwandern der RASF statt (Abb. 22). Eine perichondrozytäre Degradation des implantierten Knorpels konnte nach 60 Tagen aufgrund fehlender Chondrozyten nicht ermittelt werden. Der Invasionscore wies einen Mittelwert von  $2,2 \pm 0,7$  auf, der etwa dem der Invasion in Knorpel mit vitalen Chondrozyten entspricht (Inv:  $2,3 \pm 0,8$ ; s. „klassisches Migrationsmodell“). Da keine vitalen Chondrozyten während des Versuchszeitraums im implantierten Knorpel vorlagen, wurde eine insgesamt reduzierte Qualität der Knorpelmatrix festgestellt.

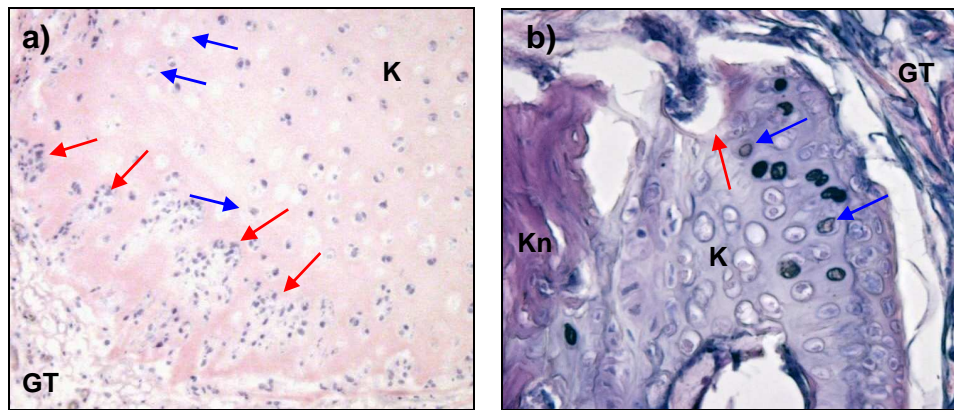


**Abb. 22:** HE-Färbung des Chondrozyten-depletierten Knorpels. Trotz fehlender Chondrozyten konnte eine starke Invasion in den Knorpel (K) beobachtet werden (rote Pfeile). Eine perichondrozytäre Degradation konnte aufgrund fehlender vitaler Chondrozyten nicht gezeigt werden. Die leeren Chondronen sind durch die grünen Pfeile dargestellt.

#### 4.2.2 Implantation speziesfremden Knorpels

Zur weiteren Analyse der Rolle der EZM wurde speziesfremder Knorpel implantiert. Dazu wurden boviner und isolierter muriner Knorpel bzw. Gelenkköpfe verwendet. Der murine Gelenkkopf sowie der bovine Knorpel wurden mit den RASF direkt koimplantiert.

Die Zerstörung des bovinen Knorpels konnte nach 60 Tagen in der SCID-Maus nachgewiesen werden (Inv:  $1,4 \pm 1,0$ ; Deg:  $1,8 \pm 0,4$ ; Abb. 23a). Auch der murine Knorpel wurde von humanen RASF invadiert und degradiert (Abb. 23b). Hier konnte jedoch durch die Implantation kompletter Gelenkköpfe kein etablierter Score erhoben werden. Auffallend war das Einwandern der RASF im Bereich des Knochen-Knorpel-Übergangs.



**Abb. 23:** HE-Färbungen speziesfremder Knorpel. In a) ist boviner Knorpel nach 60 Tagen in der SCID-Maus dargestellt. Das Einwandern der RASF in den Knorpel (rote Pfeile) sowie die perichondrozytäre Degradation (blaue Pfeile) des Knorpels konnte beobachtet werden. b) zeigt einen implantierten murinen Gelenkkopf. Auch hier waren die Invasion der RASF sowie die Degradation des Knorpels deutlich zu erkennen. Die Invasion erfolgte am Knochen-Knorpel-Übergang. Kn: Knochen; K: Knorpel; GT: Gelatine-Trägermatrix

#### 4.2.3 Analyse des murinen Ohrknorpels und der intakten Gelenke

In zuvor dargestellten Versuchen konnte gezeigt werden, dass koimplantierter humaner und für RASF speziesfremder Gelenkknorpel invadiert und degradiert wurde. Es galt nun zu analysieren, ob auch gesunde unbehandelte murine geschlossene Gelenke mit hyalinem Knorpel und der elastische Ohrknorpel der Tiere von humanen Zellen befallen und zerstört werden. Mittels immunhistochemischer Nachweise konnten humane Zellen in den gesunden Gelenken bei 2 von 18 SCID-Mäusen nachgewiesen werden. Eine Zerstörung des Knorpels wurde in beiden Fällen jedoch nicht beobachtet.

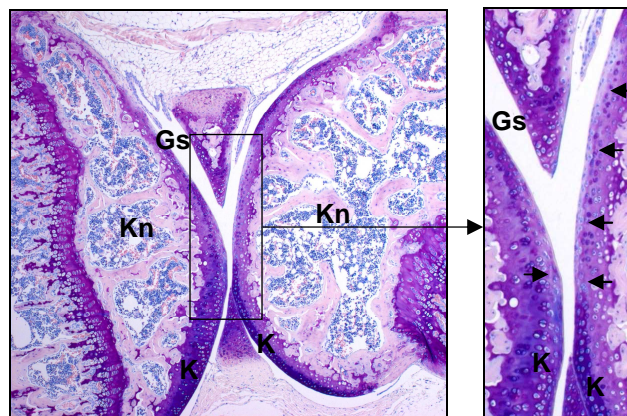
In Tieren, denen EGFP-transduzierte RASF appliziert wurden, konnten im gesunden murinen Gelenk unter UV-Licht keine fluoreszierenden humanen Zellen gefunden werden.

In 8 von 20 untersuchten Tieren konnten humane Zellen am Ohrknorpel detektiert werden. In 6 dieser 8 Tiere wurden vereinzelte, in den 2 übrigen zahlreiche RASF immunhistochemisch detektiert. Auch hier konnte kein Abbau des intakten Knorpels beobachtet werden.

### ***Invasion von RA synovialen Fibroblasten in angegriffene Knorpeloberflächen***

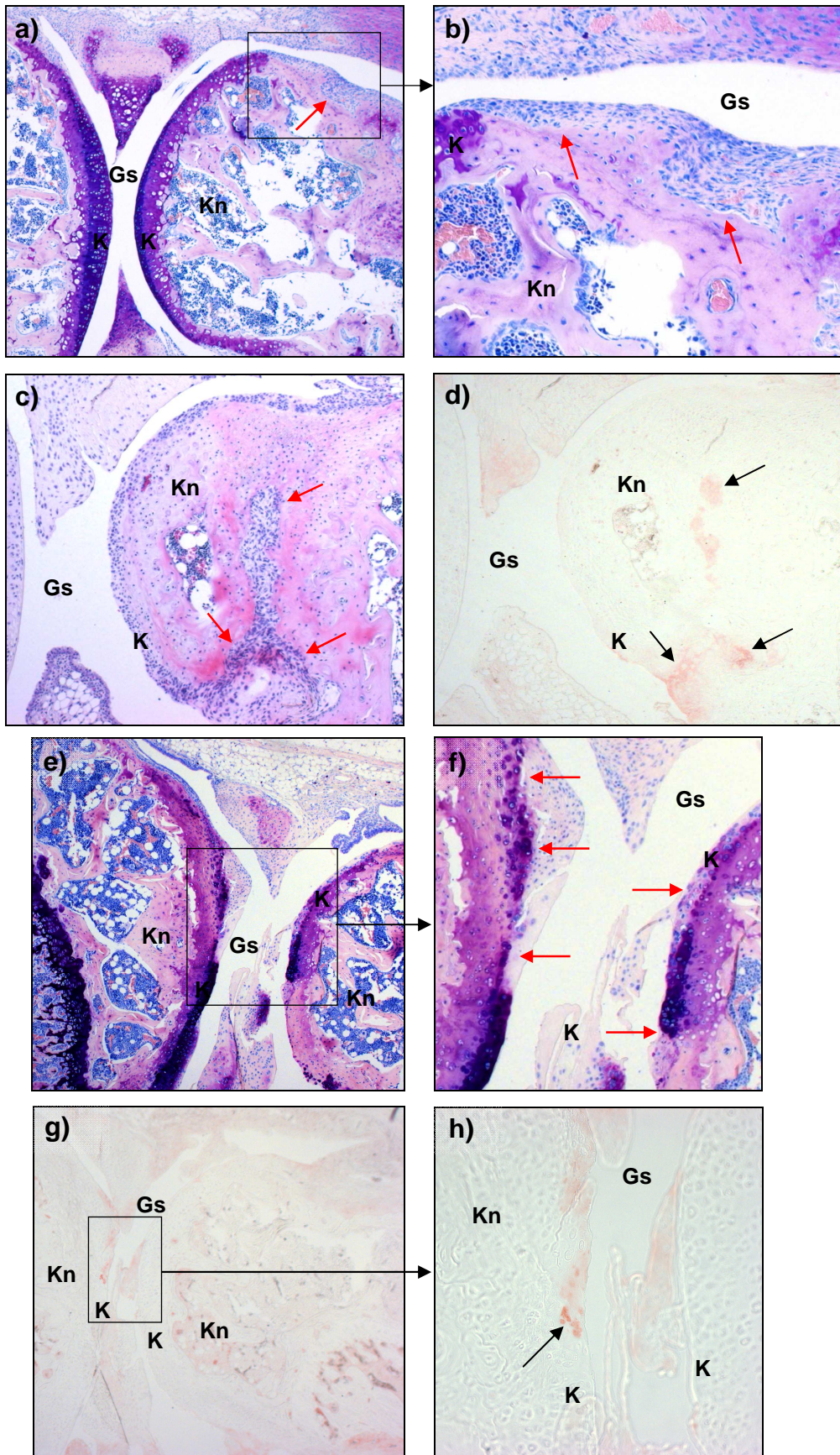
Die Kollagenase-Injektion (Blaney-Davidson EN et al., 2007) in die Kniegelenke der SCID-Mäuse führte zur erwarteten Reduktion und Zerstörung des Knorpels. Nach einigen Tagen waren die Tiere in ihrer Bewegung eingeschränkt. Sie nahmen eine Schonhaltung ein, um die geschädigten Gelenke zu entlasten.

Bereits 28 Tage nach Kollagenase-Injektion konnte am mit Kollagenase-behandelten Bein eine ausgeprägte Atrophie der Oberschenkel-, z. T. auch der Unterschenkelmuskulatur beobachtet werden. Die vollständige Streckung des Kniegelenks war bei einigen Tieren nicht mehr möglich. Eine leichte Reduktion der Knorpeldicke sowie ein Proteoglykanverlust im Bereich der Knorpeloberfläche konnten histologisch ebenfalls beobachtet werden (Abb. 24). Das jeweils unbehandelte Bein war unauffällig.



**Abb. 24:** Abbau des artikulären murinen Knorpels nach Kollagenase-Injektion. Durch Injektion der Kollagenase in das murine Gelenk kam es zum Knorpelabbau und zur Reduktion der Knorpeldicke und Zusammensetzung. Die Veränderung des Knorpels (K) konnte anhand der helleren Färbung (Giemsa-Färbung; Vergrößerung, schwarze Pfeile) verdeutlicht werden. Kn: Knochen; Gs: Gelenkspalt

Die histologischen und immunhistologischen Untersuchungen der murinen Gelenke zeigten bei Kollagenase-behandelten Gelenken mit paralleler RASF-Applikation untypische Erosionen des Knorpels und auch des Knochens (Abb. 25a-f). Diese massive Invasion war bei Tieren, die Kollagenase ohne zusätzliche RASF appliziert bekamen, nicht zu beobachten (Abb. 24). Die ausgeprägte Invasion in Knorpel- und Knochen ist untypisch für das Kollagenase-induzierte Arthrosemodell. Die Erosionen, die, ähnlich wie bei der Implantation der murinen Gelenkköpfe insbesondere am Knochen-Knorpel-Übergang auftraten (Abb. 25a-c), ähnelten frühen Erosionen von RA-Patienten. Der Nachweis humaner RASF an der Invasionszone wurde mittels spezifischer Immunhistochemie erbracht (Abb. 25d, g, h).



**Abb. 25:** Nachweis der Zerstörung des murinen Gelenks nach Kollagenase-Injektion und paralleler RASF-Applikation. In a-d) konnten tiefe Zellinvasionen (rote Pfeile) an der Knorpel (K)-Knochen (Kn)-Grenze beobachtet werden. In der Invasionszone in den Knochen von c) konnten

immunhistochemisch mit anti-humanen Vimentin-Antikörpern humane Zellen detektiert werden (d; schwarze Pfeile). Weiterhin waren schwere Erosionen des Knorpels nach Kollagenase- und zusätzlicher RASF-Zugabe im murinen Gelenk erkennbar (e-h). In den Erosionszonen des Knorpels konnten immunhistochemisch mittels anti-humaner Vimentin-Antikörper humane Zellen detektiert werden (g, h). Gs: Gelenkspalt; a, b, e, f: Giemsa-Färbung; c: HE-Färbung

### **4.3 Weg der Migration**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass RASF als zentrale Zellen im Abbauprozess des Knorpels die Fähigkeit zur Migration über lange Distanzen besitzen, sollte der Weg der Migration analysiert werden. Bislang war unklar, wie die Migration der RASF durch den Organismus erfolgt.

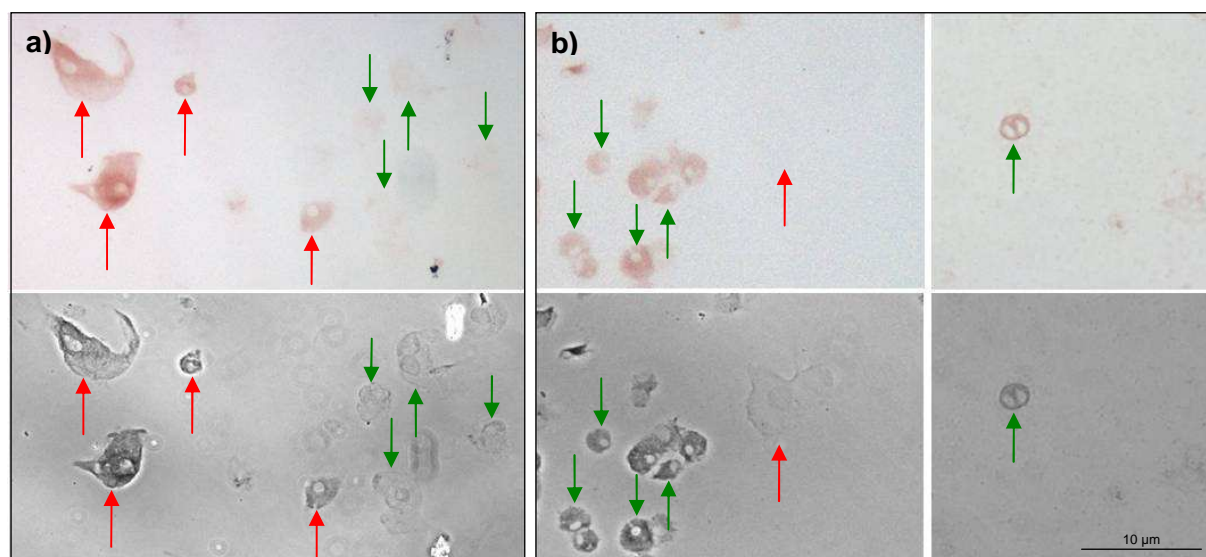
#### **4.3.1 Analyse muriner Organe**

Neben den Knorpelimplantaten wurden die verschiedenen Organe der Tiere analysiert, um den Weg der Migration der RASF durch den murinen Organismus aufzudecken. Hierfür erfolgte nach Entnahme die immunhistologische Analyse der Organe von 20 SCID-Mäusen mit speziesspezifischen Antikörpern. Folgende Organe wurden untersucht: Niere, Milz, Darm, Leber, Lunge, Herz, Lymphknoten, Haut nahe der Implantate sowie entfernt der Implantate liegende Haut. Dabei wurden Tiere aller RASF-Applikationsarten untersucht (zeitgleiche Implantation, zeitversetzte Implantation, Injektion). Es konnten einzelne Fibroblasten in der Haut nahe der Implantationsstelle sowie in der Niere und im Lymphknoten eines Tieres detektiert werden. Die meisten Zellfunde waren in der murinen Milz nachweisbar. Hier konnten in jedem untersuchten Tier zahlreiche humane Zellen detektiert werden. Dagegen blieb der Nachweis humaner Zellen im Darm, in der Lunge, im Herz, in der Leber und in der Haut entfernt vom Implantat erfolglos.

Die immunhistologische Bearbeitung und Auswertung der Organe wurden im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit von Christoph Tennie durchgeführt. Abbildungen sowie die detaillierte Auswertung sind dieser sowie der Publikation Lefèvre S et al. (2009) zu entnehmen.

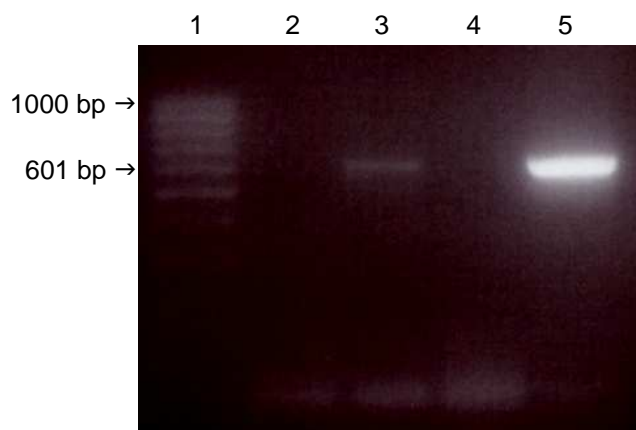
### 4.3.2 Synoviale Fibroblasten im murinen Blut

Durch vorangegangene Ergebnisse (Injektionsserien, Analyse der Organe) verdichtete sich der Verdacht, dass die Migration der Fibroblasten durch das Blutgefäßsystem stattfindet. Daher wurde geprüft, ob RASF in der Lage sind, in den Blutkreislauf einzutreten und diesen Weg zur Migration zu nutzen. Hierzu wurde das Blut der Tiere am Tag der Implantat-Entnahme abgenommen, „abgesert“ und das Blutpellet nach erfolgtem Zytospin mit Hilfe immunzytochemischer Methoden auf das Vorhandensein von humanen Zellen untersucht. RASF konnten im isolierten Blut in 43% der Tiere nachgewiesen werden. Dabei wurden bei den RASF-positiven Tieren die Zellen bei 25% i.v., bei 10% s.c. und bei 8% i.p. appliziert. Die mit anti-Vimentin-Antikörpern detektierten Zellen ähnelten auch nach dem Zytospin phänotypisch synovialen Fibroblasten (Abb. 26a). Die gefärbten humanen Zellen waren aufgrund ihres Aussehens (Größe, Form) bereits von murinen Zellen zu unterscheiden. Im Phasenkontrast war deutlich zu erkennen, dass sich außer den angefärbten Zellen noch weitere, nicht gefärbte kleinere kernhaltige Zellen im Sichtfeld befanden. Bei Verwendung anti-muriner Antikörper (anti-H-2D<sup>d</sup>) konnten ausschließlich diese murinen Zellen detektiert werden (Abb. 26b).



**Abb. 26:** Immunzytochemischer Nachweis humaner und muriner Zellen im murinen Blut. a) Mit Hilfe anti-humaner Vimentin-Antikörper konnten humane Zellen (rote Pfeile) im murinen Blut nachgewiesen werden. Murine Zellen (grüne Pfeile) konnten mit anti-humanen Antikörpern nicht gezeigt werden. b) zeigt die Immunzytochemie mit anti-murinen Antikörpern (anti-H-2D<sup>d</sup>). Murine Zellen (grüne Pfeile) wiesen eine deutliche Färbung sowie einen unterschiedlichen Phänotyp im Vergleich zu humanen Zellen auf (rote Pfeile). Im unteren Teil der Abbildung ist der jeweilige Bildausschnitt im Phasenkontrast dargestellt, um die Anwesenheit nicht gefärbter Zellen zu verdeutlichen.

Um das Ergebnis der Zellfunde im murinen Blut zu verifizieren und um eventuelle Kreuzreaktivitäten der Antikörper auszuschließen, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Weiblichen SCID-Mäusen wurde Knorpel von weiblichen Personen zusammen mit RASF aus männlichen Patienten nach dem „klassischen Migrationsmodell“ implantiert. Nach Blutentnahme, DNA-Isolation und Aufkonzentration der DNA wurde eine PCR mit für das auf dem Y-Chromosom liegenden *sry*-Gen spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Die erwartete Produktlänge betrug 601 bp. Die spezifische Bande konnte in der nachfolgenden Agarose-Gelelektrophorese nach Reamplifikation des PCR-Produkts eindeutig gezeigt werden (Abb. 27). Bei den männlichen, Y-Chromosom enthaltenden Zellen im Blut kann es sich ausschließlich um die applizierten RASF handeln.



Spur 1: 100 bp DNA-Leiter

Spur 2: Negativkontrolle (dH<sub>2</sub>O statt DNA-*template*)

Spur 3: DNA aus isoliertem murinen Blut

Spur 4: Negativkontrolle (DNA aus weiblichen Probanden)

Spur 5: Positivkontrolle (DNA aus männlichen Probanden)

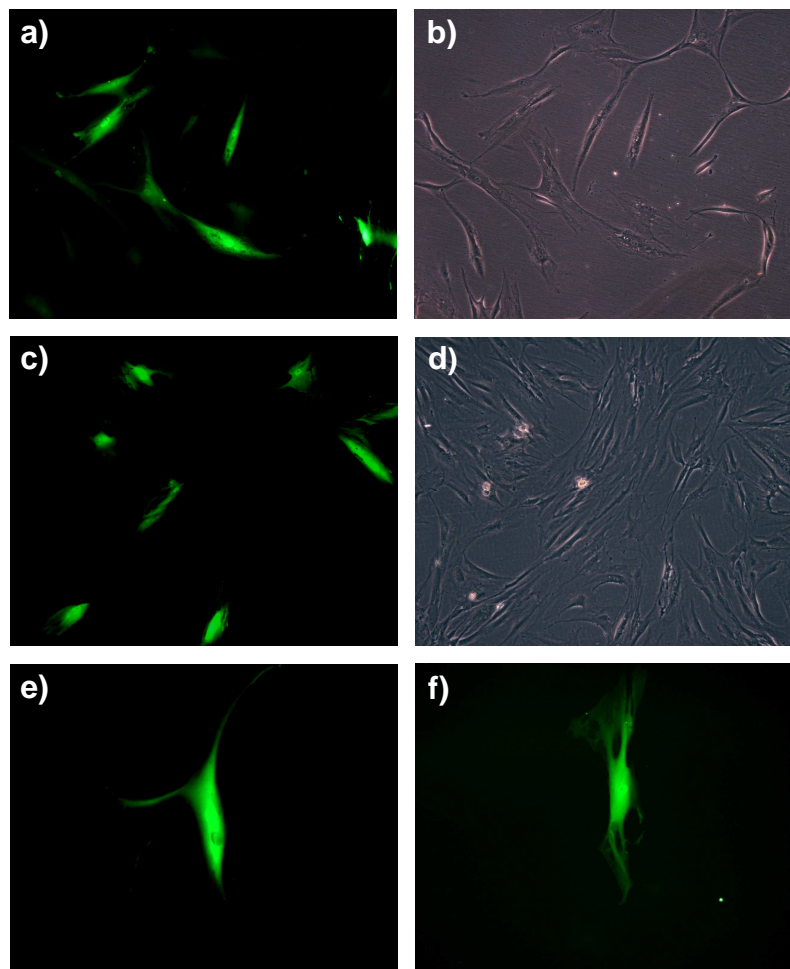
**Abb. 27:** PCR der DNA aus isoliertem Mausblut. Bei Verwendung spezifischer *primer* für das *sry*-Gen wurde der Nachweis humaner Zellen im murinen Blut auf molekularbiologischer Ebene erbracht. In Spur 3 ist die PCR dargestellt, die mit DNA aus murinem Blut durchgeführt wurde. Spur 5 zeigt die Positivkontrolle mit DNA aus männlichen Patienten. In den Spuren 2 und 4 sind die Negativkontrollen dargestellt. Das Fragment des *sry*-Gens besitzt eine Größe von 601 bp.

Anhand dieser beiden Methoden konnte die Anwesenheit der humanen RASF im murinen Blut nachgewiesen werden.

Ein weiterer Nachweis der humanen Zellen im murinen Blut sollte mittels FACS-Analyse erfolgen. Allerdings konnte hier kein positiver Nachweis EGFP-transduzierter RASF im isolierten Blut der Mäuse erzielt werden. Es ist anzunehmen, dass die

Menge der isolierten transduzierten RASF unter der Nachweisgrenze des FACS-Geräts lag. Auch eine nicht ausreichende Spezifität der zusätzlich gewählten Antikörper (MHC class I  $\alpha/\beta$ , Mitochondria, GFP bzw. Vimentin) ist eine mögliche Erklärung für den ausgebliebenen Nachweis.

Ein Grund für die möglicherweise zu geringe Anzahl humaner Zellen im Blut könnte eine zu hoch gewählte MOI bei den adenoviral transduzierten RASF darstellen. In paralleler *in vitro*-Kultur konnte nach erfolgreicher Transduktion (Abb. 28a, b, e) ein Absterben der RASF beobachtet werden (Abb. 28c, d, f). Außerdem zeigten vitale RASF eine beginnende Abschwächung der Fluoreszenz durch zunehmende Methylierung des CMV-Promotors und eine Änderung ihrer Morphologie nach etwa 15 Tagen (Abb. 28c, d, f). Da die ersten zu analysierenden Blutproben 28 Tage nach RASF-Transduktion und Applikation in die Tiere analysiert wurden, ist es möglich, dass die vorhandene Fluoreszenz schon zu diesem Zeitpunkt nicht mehr zur Detektion im FACS-Gerät ausreichte.

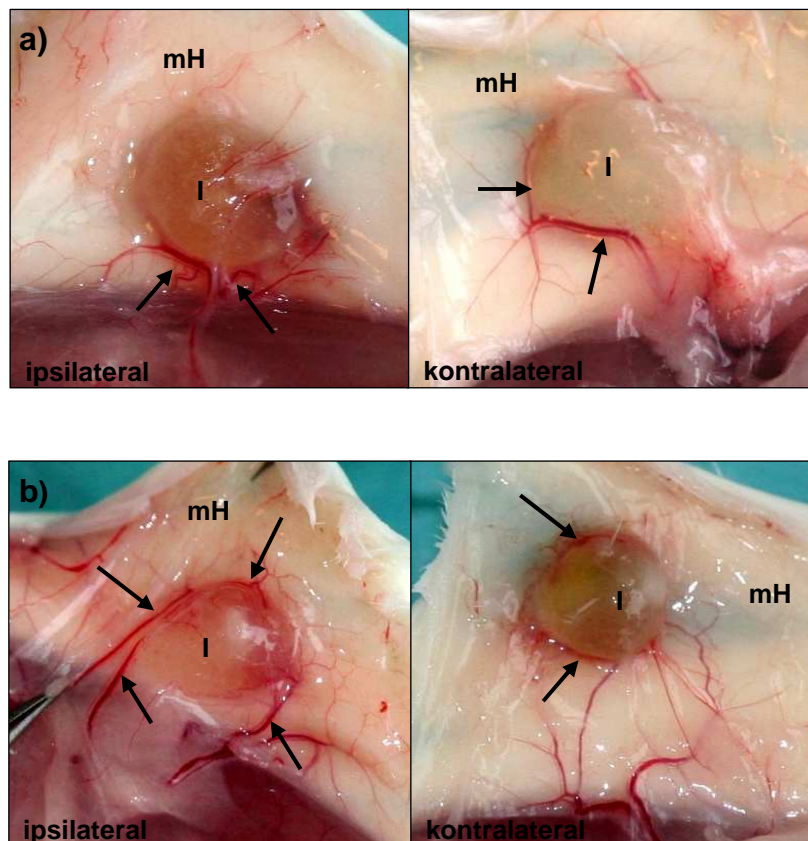


**Abb. 28:** Nachweis der erfolgreichen adenoviralen Transduktion der RASF. In paralleler *in vitro*-Kultur erfolgte die Kontrolle der Fluoreszenz über den Versuchszeitraum. a) zeigt die fluoreszierenden RASF unter UV-Licht 4 Tage nach Transduktion; b) zeigt denselben Bildausschnitt im Phasenkontrast. Nach

15 Tagen ist eine Abschwächung der Fluoreszenz sowie eine Änderung der Morphologie der transduzierten RASF zu beobachten (c); d) gleicher Ausschnitt im Phasenkontrast). e) und f) zeigen jeweils einen einzelnen EGFP-transduzierten RASF. e) stellt Tag 4 nach Transduktion dar, f) Tag 15. Eine Änderung der Morphologie ist deutlich erkennbar.

### 4.3.3 Zeitpunkt der Angiogenese

Um die Angiogenese nach Implantation des Knorpels zu demonstrieren, wurde die Gefäßneubildung in den SCID-Mäusen rund um die Implantate nach 7 und 14 Tagen nach Implantation untersucht. Neu gebildete Gefäße an und in den Implantaten konnten nach 14 Tagen bzw. bereits nach 7 Tagen gezeigt werden (Abb. 29a, b). Allerdings konnte auch nach 14 Tagen noch kein Einwandern der Zellen in den Knorpel nachgewiesen werden.



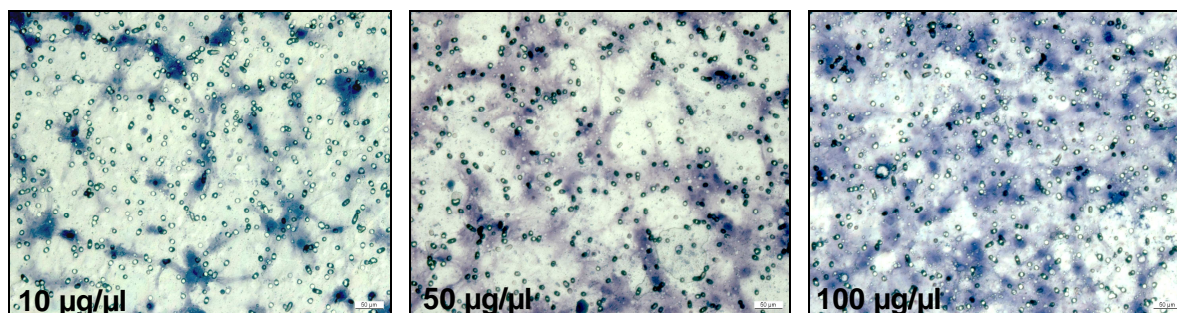
**Abb. 29:** Nachweis der Gefäßneubildung an den eingesetzten Knorpelimplantate. Schon nach 7 Tagen sind sowohl am ipsilateralen (a; links) als auch am kontralateralen Implantat (a; rechts) neu gebildete Gefäße (schwarze Pfeile) zu erkennen. Nach 14 Tagen ist eine Gefäßzunahme rund um die eingesetzten Knorpel-Schwamm-Komplexe zu beobachten (b; links: ipsilateral; rechts: kontralateral). I: Implantat; mH: murine Haut

## 4.4 Rolle der Knorpelmatrix

Da die Vitalität der Chondrozyten und die von ihnen kontinuierlich sezernierten Moleküle (Cytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren) sowie der Spezieshintergrund des Knorpels keine Rolle bei der RASF Migration und Invasion zu spielen scheinen, wurden die Knorpelmatrix sowie deren Bestandteile in Hinblick auf ihren Einfluss auf die RASF-Migration analysiert.

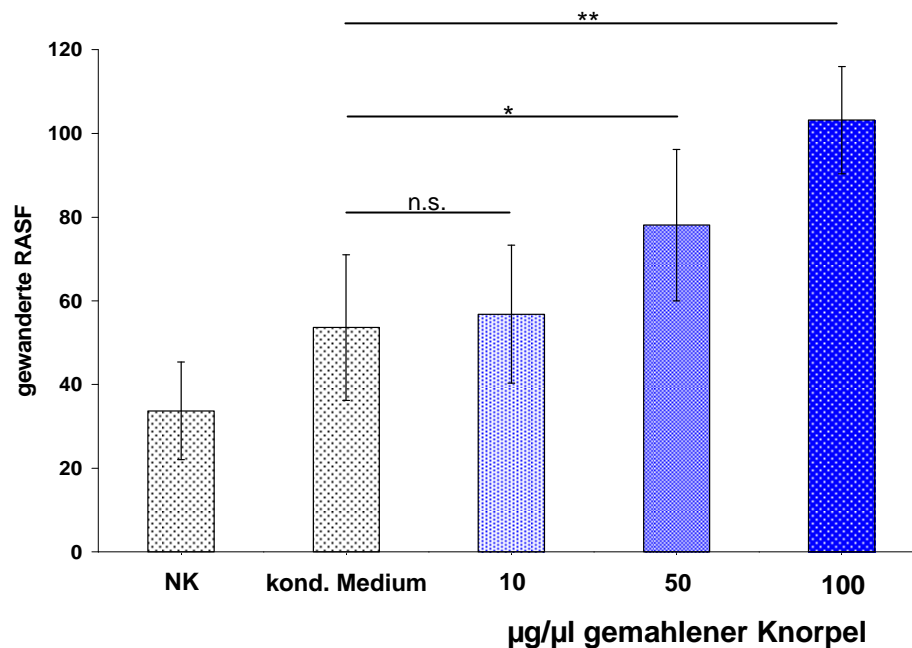
### 4.4.1 Analyse des chemotaktischen Potentials der Knorpelmatrix

Das chemotaktische Potential der EZM des Knorpels wurde in Chemotaxis-Experimenten bestimmt. Zunächst wurde fein gemahlener humaner Knorpel als potentiell chemotaktisch aktive Substanz in Hinblick auf die Migration der RASF analysiert. Dabei wurden folgende Mengen des gemahlene Knorpels in der Boyden-Kammer eingesetzt: 10, 50 und 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Nach Auszählen der migrierten Zellen stellte sich heraus, dass die RASF dosisabhängig zur Knorpelmatrix migrieren. Auch sehr hohe Knorpelmatrix-Konzentrationen führten nicht zu einer Inhibition der RASF-Migration (Abb. 30).



**Abb. 30:** Dokumentation der migrierten RASF. Bereits beim Betrachten der Membran unter dem Mikroskop konnte eine Zunahme der migrierten RASF mit zunehmender Knorpelmenge (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  → 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  → 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) beobachtet werden.

10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  gemahlener Knorpel führten bereits zu einem leichten Anstieg der Zellmigration. Bei 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  gemahlene Knorpels konnte ein signifikanter Anstieg migrierender RASF in Vergleich zur Kontrolle mit konditioniertem Medium festgestellt werden (Abb. 31).



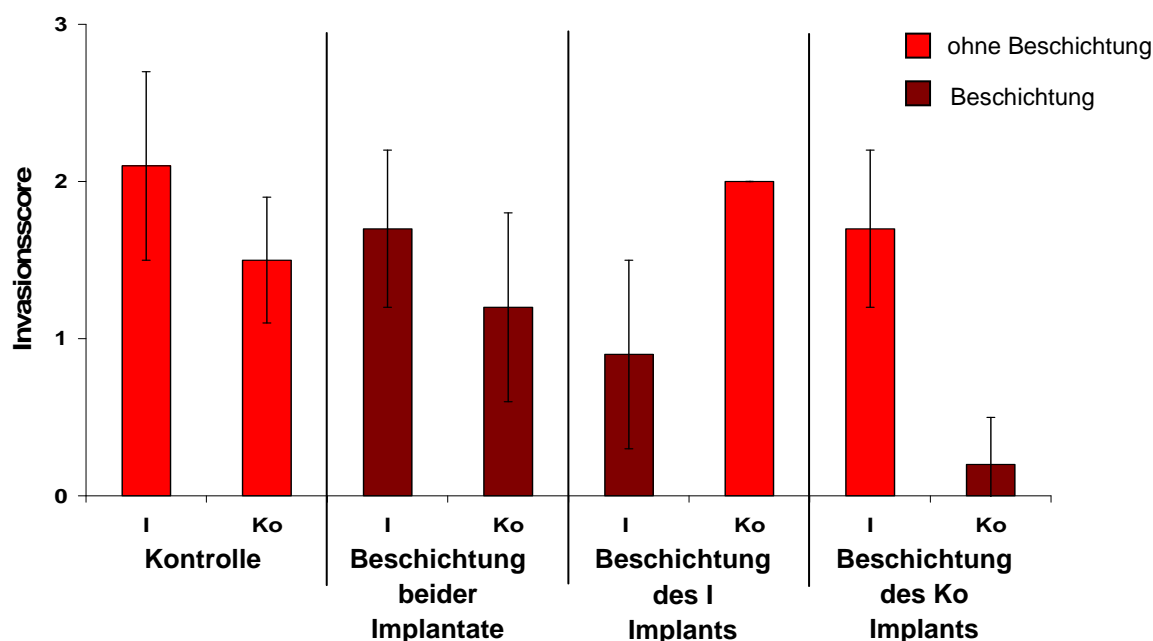
**Abb. 31:** Chemotaktisches Potential der Knorpelmatrix. Eine dosisabhängig ansteigende Migration der RASF zur Knorpelmatrix konnte beobachtet werden. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; n.s.: nicht signifikant

#### 4.4.2 Analyse definierter Bestandteile der Knorpelmatrix *in vivo*

Da die EZM des Knorpels die RASF-Migration fördert, wurden *in vivo*-Experimente mit einzelnen bzw. kombinierten Matrixkomponenten durchgeführt. Hierbei wurden die Kunststoff-Trägerschwämme mit einzelnen isolierten Matrixbestandteilen (Fibronektin, Aggrekan, Kollagen II) oder Kombinationen (PuraMatrix Hydrogel, *growth factor reduced* Matrigel, Matrigel) beschichtet und in unterschiedlichen Variationen den Tieren mit oder ohne RASF, jedoch zusammen mit Knorpel implantiert (s. Methoden 3.3.6). Dies sollte weiteren Aufschluss über die Faktoren geben, die eine gezielte Migration der RASF fördern oder möglicherweise in einer verstärkten Retention der Zellen resultieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass vor allem matrixassoziierte Wachstumsfaktoren bei der Migration der Zellen und nachfolgender Knorpelzerstörung eine Rolle zu spielen scheinen (Abb. 32).

Zunächst konnte nach Beschichtung der Trägermatrix beobachtet werden, dass es bei allen Gruppen nicht zu einem Zurückhalten der RASF am ipsilateralen Implantationsort kommt. Bei der Beschichtung der Trägermatrix mit Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel konnte eine Migration der Zellen aus dem

ipsilateralen Trägerschwamm heraus gezeigt werden. Die Migration zu den Knorpeln, die in mit Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel versehenen Trägerschwämmen vorlagen, war dagegen fast nicht zu beobachten. Die Einwanderung in den Knorpel war zur Kontrolle signifikant reduziert ( $p < 0,001$ ). Die RASF migrierten zu oder invadierten verstärkt in den in unbeschichtete Schwämme inserierten Knorpel. War die ipsi- als auch die kontralaterale Seite mit beschichteten Trägermatrices versehen, erfolgte im Vergleich zur Kontrolle eine reduzierte, aber nicht signifikante Invasion der Zellen. Dabei war die Tendenz der Invasion in den Knorpel im Hinblick auf die Kontrolle jedoch gleich (Abb. 32).



**Abb. 32:** Einfluss der Wachstumsfaktor-reduzierten Matrix auf die Migration der RASF. Bei Beschichtung der Trägermatrix mit Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel reduzierten sich die Migration und Invasion der RASF in den beschichteten Knorpel. Bei Beschichtung beider Implantate änderte sich zwar nicht die Tendenz der Invasion in beide Knorpel, allerdings ist der Invasionsscore (verglichen mit der Kontrolle) geringer. Wurde der ipsilaterale Trägerschwamm (I) mit Wachstumsfaktor-reduzierter Matrix versehen, so war die Einwanderung in den kontralateral implantierten Knorpels (Ko) wesentlich stärker als in den ipsilateral implantierten. Bei Beschichtung des kontralateralen Implantats mit der entsprechenden Matrix war hier im Vergleich zum unbehandelten ipsilateralen Knorpel eine Invasion der RASF fast nicht zu erkennen.

Das gleiche Ergebnis, wenn auch nicht so deutlich, konnte ebenfalls bei Analyse der Knorpeldegradation beobachtet werden. Auch hier war eine reduzierte Degradation des Knorpels, der in mit Wachstumsfaktor-reduzierter Matrix beschichteten Schwämmen inseriert war, zu beobachten.

## 4.5 Adhäsionsmoleküle an der Invasionszone

Zur Analyse der für die Adhäsion verantwortlichen Moleküle an der Invasionszone des implantierten Knorpels wurden dort lokalisierte invadierende Zellen mittels LMM aus dem Gewebe isoliert. Nach anschließender RNA-Isolation, reverser Transkription und *real time*-PCR mit entsprechenden *primern* wurde der Schwerpunkt auf die Analyse der dort exprimierten Integrine gelegt.

Nach Auswertung der *real time*-PCR Ergebnisse konnten in allen untersuchten Proben der knorpelinvadierenden RASF die Expression der Integrin-Untereinheiten  $\alpha_5$  und  $\beta_5$  nachgewiesen werden. Drei bzw. zwei der vier Proben wiesen die Untereinheiten  $\beta_1$  bzw.  $\alpha_v$  und  $\beta_4$ , eine Probe Integrin  $\alpha_1$  auf. Die Untereinheiten  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  wurden in keiner der analysierten invadierenden RASF exprimiert. Diese Ergebnisse decken sich zum Teil mit zuvor erhaltenen Resultaten (Lefèvre S et al., 2009), jedoch waren die Ergebnisse bei den untersuchten Proben nicht konstant. Gründe könnten in der individuellen Variation der unterschiedlichen Proben begründet sein. Auch ist die verwendete Methode fehleranfällig. Eine Ursache für die teilweise sehr inkonsistenten Ergebnisse könnte u. a. die Degradation der RNA darstellen. Diese könnte bspw. durch nicht ausreichend schnelles Einfrieren der Implantate oder während der zeitaufwändigen LMM stattgefunden haben. Eventuell muss auch die Zahl der mittels LMM isolierten RASF erhöht werden, um durch eine ausreichende Menge verwendbarer RNA aussagekräftigere Resultate zu erzielen, da die Bereiche der invadierenden Fibroblasten in den Knorpel sehr klein waren.

Der Nachweis der Integrin-Expression an der Invasionszone in den Knorpel mittels IHC stellte keine Alternative zur LMM mit anschließender *real time*-PCR dar. Der implantierte Knorpel wies in zuvor in der Arbeitsgruppe durchgeführten Versuchen eine starke unspezifische Färbung nach Inkubation mit anti-Integrin-Antikörpern auf, die teilweise durch die unspezifische Adhäsion der Antikörper an die Knorpelmatrix und die Gelatinmatrix des Trägerschwamms bedingt war. Durch die starke Autofluoreszenz der Matrix war eine Immunofluoreszenz zum Nachweis der Integrine in den Implantaten ebenfalls problematisch.

Da eine eindeutige Interpretation sowie eine Quantifizierung der exprimierten Adhäsionsmoleküle und somit eine gezielte Inhibition daher nicht möglich war, wurde über andere Wege versucht, die Migration bzw. Adhäsion der RASF zu inhibieren.

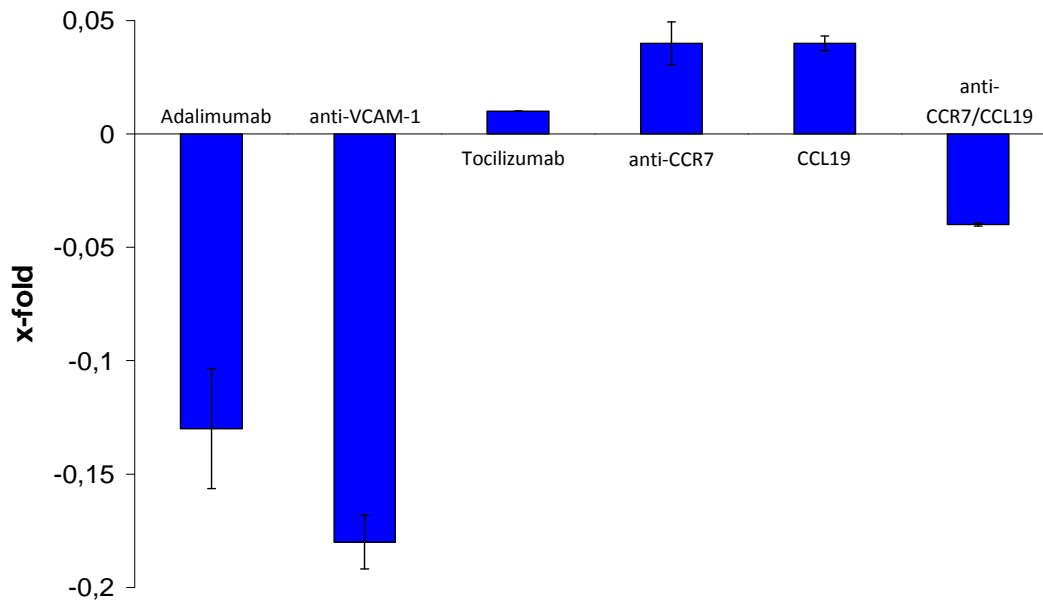
## 4.6 Therapeutische Ansätze zur Analyse und Inhibition der Migration

Die Auswirkungen möglicher Faktoren, die die Migration, Transmigration und Adhäsion der RASF beeinflussen, wurden mit Hilfe chemokinetischer und chemotaktischer Methoden *in vitro* sowie *in vivo* analysiert. Dabei kamen u. a. in der RA-Therapie erfolgreich eingesetzte sowie *in vitro* vielversprechend getestete Antikörper zum Einsatz.

### 4.6.1 Analyse der ungerichteten Migration

Die der Migration der RASF zugrundeliegenden Mechanismen insbesondere bezüglich der endothelialen Transmigration sowie der gerichteten Migration spezifisch zum exponierten Knorpel, sind bisher unklar. Um die gerichtete Migration von der ungerichteten Bewegung (Chemokinese) der RASF abzugrenzen, wurden *scrape motility assays* durchgeführt. Hierzu wurden Substanzen verwendet, die möglicherweise einen Einfluss auf die RASF-Migration ausüben: anti-humane CCR7-Antikörper, CCL19 (beides einzeln sowie in Kombination) (Brühl H et al., 2008), Adalimumab, anti-humane VCAM-1-Antikörper und der IL-6-Inhibitor Tocilizumab. Nach Inkubation der RASF mit den entsprechenden Substanzen erfolgte nach insgesamt 18stündiger Migration die Auswertung der migrierten RASF.

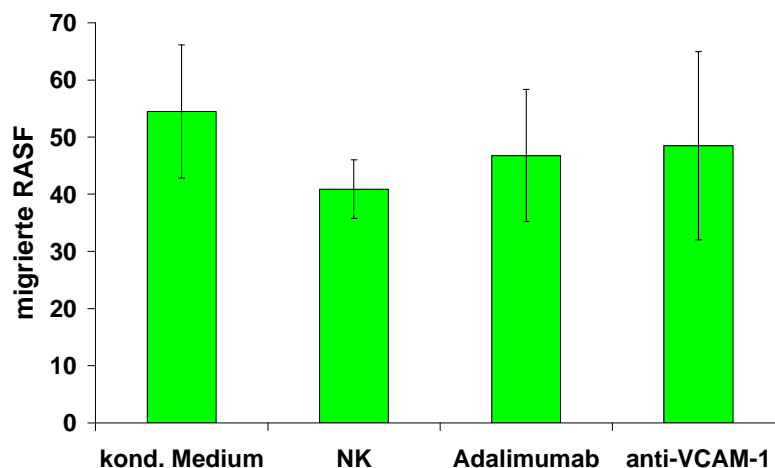
Es konnte gezeigt werden, dass Adalimumab und vor allem anti-VCAM-1 Einfluss auf die ungerichtete Bewegung der RASF haben. Beide Antikörper führten nach 18stündiger Inkubation zur Reduktion der Zellmotilität. Bei Zugabe der Antikörper gegen CCR7 und dessen Liganden CCL19 sowie einer Kombination beider Substanzen konnte nur eine geringe Änderung der Migration der RASF beobachtet werden. Auch die Zugabe von Tocilizumab zeigte keinen Effekt (Abb. 33).



**Abb. 33:** Graphische Darstellung der migrierten RASF im *scrape motility assay*. Die Inkubation der RASF mit Adalimumab und vor allem mit VCAM-1 führte zu einer Reduktion der ungerichteten Migration der RASF. Die weiteren getesteten Substanzen (Tocilizumab, anti-CCR7-Antikörper, CCL19 sowie deren Kombination) zeigten keine Auswirkung auf die Chemokinese der Zellen.

#### 4.6.2 Chemotaktische Effekte auf rheumatoide synoviale Fibroblasten

Die zuvor auf ihre chemokinetische Wirkung im *scrape motility assay* getesteten Substanzen Adalimumab und anti-VCAM-1-Antikörper wurden in einem weiteren Experiment im Hinblick auf die zielgerichtete, chemotaktische Migration der RASF überprüft. Dabei konnte keine signifikante Reduktion der Migration im Vergleich zur Kontrolle (konditioniertes Medium mit 2% FCS) beobachtet werden. Adalimumab und anti-VCAM-1-Antikörper scheinen keinen chemotaktischen Einfluss auf die gerichtete Migration der RASF auszuüben (Abb. 34).



**Abb. 34:** Auswirkung von Adalimumab und VCAM-1 auf die gerichtete Migration der RASF. Es konnte keine signifikante Reduktion der RASF-Migration im Vergleich zur Kontrolle mit kond. Medium beobachtet werden. Kond. Medium: konditioniertes Medium mit 2% FCS; NK: Negativkontrolle

#### 4.6.3 Inhibition der Adhäsion und Transmigration *in vivo*

Im *scrape motility assay* konnte gezeigt werden, dass die ungerichtete Bewegung der RASF durch anti-VCAM-1-Antikörper und Adalimumab *in vitro* reduziert werden kann. Obwohl die gerichtete Migration der RASF (Chemotaxis) nicht durch Adalimumab oder anti-VCAM-1 reduziert wurde, könnte die reduzierte Zellbewegung zum Zurückhalten der RASF im Implantat beitragen. Ob Adalimumab oder anti-VCAM-1 einen Einfluss auf die Migration der RASF haben, sollte *in vivo* im SCID-Mausmodell überprüft werden. Dabei wurden den Mäusen in bestimmten Abständen definierte Konzentrationen der humanen anti-VCAM-1-Antikörper bzw. des Adalimumabs injiziert. Eine Reduktion oder Hemmung der Migration bzw. der anschließenden Einwanderung in den implantierten Knorpel konnte *in vivo* nicht beobachtet werden. Die Scores nach der Injektion der anti-VCAM-1-Antikörper lagen bei  $1,8 \pm 0,6$  (Inv) bzw.  $1,4 \pm 0,5$  (Deg). Nach Applikation des TNF $\alpha$ -Inhibitors Adalimumab zeigten sich Werte von  $1,7 \pm 0,8$  (Inv) bzw.  $1,5 \pm 0,7$  (Deg). Die Scores der Kontrollgruppen lagen etwa im gleichen Bereich, so dass kein signifikanter Unterschied beobachtet werden konnte. Dabei machte es im Falle der Zugabe des Adalimumabs keinen Unterschied, ob die Antikörper alle 10 oder alle 14 Tage i.p oder s.c. appliziert wurden.

## 4.7 Wiedererlangung der T- und B-Zellaktivität der SCID-Mäuse

Nach Abschluß der einzelnen Tierserien wurde das Serum aller SCID-Mäuse mittels ELISA auf murines IL-6 und, bei erhöhter Menge im Serum, zusätzlich auf murines TNF $\alpha$  untersucht. Da der Gendefekt bei SCID-Mäusen unvollständig sein kann, kann mit zunehmendem Alter vereinzelt die Fähigkeit zur eingeschränkten T- und B-Zellbildung entwickelt werden. Mittels ELISA könnte eine erhöhte Konzentration muriner inflammatorischer Zytokine auf eine gewisse Lymphozytenaktivität hinweisen. In Einzelfällen konnte eine erhöhte mIL-6- und mTNF $\alpha$ -Konzentration festgestellt werden. Diese Tiere bzw. deren Implantate wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

## 5 DISKUSSION

Die Pathophysiologie der RA konnte in den vergangenen Jahren mit Hilfe immunologischer und molekularbiologischer Techniken und Untersuchungsansätze weiter erforscht und einige Aspekte besser verstanden werden. Aktivierte synoviale Fibroblasten nehmen im Verlauf der Gelenkzerstörung eine zentrale Rolle ein. Sie besitzen durch ihren veränderten aggressiven Zustand die Fähigkeit, durch die Produktion Matrix-degradierender Enzyme maßgeblich zur Zerstörung artikulären Knorpels beizutragen (Müller-Ladner U et al., 1995; Müller-Ladner U et al., 1996). Dieses aggressive, aktiv destruierende Verhalten konnte bislang bei keinen anderen Synovialzellen nachgewiesen werden. Des Weiteren werden durch die Fibroblasten-vermittelte Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine die Entzündung aufrecht erhalten und weitere inflammatorische Zellen rekrutiert (Müller-Ladner U et al., 2007), wodurch es zur Progression der Erkrankung kommen kann.

Trotz der bisherigen zahlreichen und vielversprechenden Ergebnisse sind noch viele zentrale Vorgänge der RA-Pathogenese unbekannt. Dazu gehören z. B. Mechanismen zur Entstehung und Progression der RA, der symmetrischen Ausbreitung der Erkrankung sowie weitere relevante Mediatoren, die zur Zerstörung des Gelenks beitragen. RASF wurden als Effektorzellen in der Progression der RA lange weitgehend ignoriert, obwohl ihr knorpelzerstörendes Potential schon länger bekannt war (Müller-Ladner U et al., 1996; Neumann E et al., 2002).

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Analyse der RASF als Effektorzellen in der RA, deren Bedeutung bei der Ausbreitung der Erkrankung sowie den Faktoren, die die Migration der RASF bedingen. Die Fähigkeit der RASF, im SCID-Mausmodell an Knorpel zu adhären und ihn aktiv zu invadieren (Müller-Ladner U et al., 1996; Neumann E et al., 2002), stellte die Grundlage der aktuellen Arbeit dar.

### 5.1 Das Migrationspotential

Durch die Synthese von Zytokinen, Chemokinen, MMPs sowie verschiedener Matrixkomponenten besitzen RASF die Fähigkeit, mesenchymale Strukturen wieder herzustellen (Pap T et al., 2000a; Müller-Ladner U et al., 2005). Dieser Prozess findet bspw. auch bei der Wundheilung statt. Hier werden ab einer bestimmten Phase des

Wundheilungsprozesses Fibroblasten durch vermehrt vorhandene chemotaktische und aktivierende Substanzen aktiviert, was zur temporären Veränderung ihrer Funktion führt (Martin P, 1997; Eckes B et al., 1999; Beurden HE et al., 2006; Darby IA und Hewitson TD, 2007). Sie sind dann begrenzt in der Lage, gezielt über kurze Distanzen zu migrieren.

Obwohl synoviale Fibroblasten als gewebständige Zellen angesehen werden, ist es ihnen möglich, über kurze Distanzen innerhalb eines Gelenks zu migrieren (García-Vicuña R et al., 2004; Takahara K et al., 2004). Die gerichtete Migration der Fibroblasten inklusive der RASF auf chemotaktisch aktive Substanzen hin konnte bereits in verschiedenen Studien *in vitro* über kurze Strecken als Antwort auf verschiedene Stimuli (z. B. Chemokine) dargestellt werden (García-Vicuña R et al., 2004). Nach der dauerhaften Aktivierung durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Chemokine und den Kontakt zu anderen Zelltypen sind RASF in der Lage, sich innerhalb des Synovialgewebes zu bewegen, an Knorpel zu adhären, um ihn anschließend aktiv zu invadieren. Die Fähigkeit der RASF zur Migration über weite Distanzen und über Gewebsgrenzen hinaus war bisher nicht bekannt.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass RASF *in vivo* von ihrem Ursprungsort ausgehend zur gezielten Migration über weite Distanzen durch das Blutgefäßsystem in der Lage sind. Dabei behalten sie ihr aggressives, zerstörendes Potential bei und wandern in entfernt implantierten Knorpel ein.

Im SCID-Mausmodell der RA (Abb. 5, 6) kann über einen langen Zeitraum die Situation im Gelenk sowie das Zusammenspiel bestimmter Komponenten eines menschlichen Gelenks zum Teil nachgestellt bzw. in Abwesenheit anderer Zellen oder humaner Faktoren isoliert betrachtet werden. So konnte gezeigt werden, dass RASF die Fähigkeit haben, Knorpel in einem betroffenen Gelenk abzubauen, was durch das mit RASF koimplantierte Knorpelstück simuliert wird (Abb. 5, 12a) (Müller-Ladner U et al., 1996; Neumann E et al., 2002). RASF waren erstaunlicherweise in der Lage, ihr umgebendes Gewebe zu verlassen und durch den (murinen) Organismus zu einem gesunden, noch nicht erodierten Knorpel zu migrieren. Am Knorpel angekommen, adhärten sie, invadierten und degradierten ihn, was durch die Implantation eines RASF-frei implantierten Knorpelstücks nachgewiesen wurde (Abb. 6, 12b). Diese Migrationsfähigkeit humaner RASF ging weit über eine normale Fibroblastenbewegung innerhalb eines Gewebes, einer Struktur oder innerhalb eines Gelenks hinaus und scheint für RASF spezifisch zu sein. Andere, zur Kontrolle

verwendete Zellen zeigten dieses Verhalten nicht. In gewisser Weise können Parallelen zur Metastasierung von Tumorzellen gezogen werden. Auch hier verlassen transformierte, aktivierte Zellen ihre ursprüngliche Umgebung. Zunächst kommt es, ähnlich wie bei der RA, durch Produktion proangiogenetischer Faktoren zur gesteigerten Angiogenese um und in den Primärtumor, wodurch die Versorgung des entstehenden Tumors sichergestellt wird. Anschließend erfolgen, nach Adhäsion der Tumorzellen an die Gefäßwände und der Produktion matrixdegradierender Enzyme, die Extravasation einzelner oder einiger Tumorzellen in das Lymph- oder Blutgefäßsystem, das Überleben im Blutkreislauf und der Austritt an entfernt liegenden Geweben bzw. Organen (Fidler IJ, 2003; Langley RR und Fidler IJ, 2007). Im Unterschied zu malignen Tumoren kommt es jedoch bei der RA nicht zu einer unkontrollierten Proliferation der zum Knorpel migrierenden synovialen Fibroblasten (Hunter KW et al., 2008). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass sich die RASF in ihrer Proliferation nicht von anderen synovialen Fibroblasten unterscheiden. Zudem ist die Proliferation der RASF unabhängig von ihrem invasiven Verhalten (Kuenzler P et al., 2003; Seemayer CA et al., 2003).

Weder humane dermale Fibroblasten sowie immortalisierte Fibroblastenzelllinien (Müller-Ladner U et al., 1996; Neumann E, unveröffentlichte Daten) noch OASF (Abb. 13, 14) invadierten und degradierten den in SCID-Mäuse implantierten Knorpel. Murine Fibroblasten waren an der Destruktion des implantierten Knorpels ebenfalls nicht beteiligt. Dies wurde durch immunhistochemische Untersuchungen unter Verwendung speziesspezifischer Antikörper (Abb. 16) sowie durch die Implantation humanen Knorpels ohne RASF demonstriert. Es konnten nur wenige murine Zellen in unmittelbarer Nähe des Knorpels detektiert werden. Zusätzlich wurde in einem weiteren Ansatz die Implantation des Knorpels unter die Nierenkapsel der SCID-Maus durchgeführt, um die Beteiligung muriner Fibroblasten auszuschließen. Dadurch konnte ein Einwandern muriner Fibroblasten aus der Haut durch die subkutane Implantation ausgeschlossen werden. Die Versorgung des Knorpels war sowohl an dieser Stelle als auch bei subkutaner Implantation gewährleistet. Auch hier war die Migration zum zellfrei implantierten Knorpel feststellbar. In verschiedenen Experimenten konnte weiterhin gezeigt werden, dass die verwendeten Gelatine- oder Kunststoffträgermatrices die Migration und Invasion der RASF nicht beeinflussten (Abb. 15). Eine geringfügig sichtbare Invasion der OASF in den implantierten Knorpel kann mit einer eventuellen Vorschädigung des in den Implantationsversuchen

verwendeten Knorpels erklärt werden. Der Knorpel stammte aus den Kniegelenken von Arthrose-Patienten. Obwohl die verwendeten Knorpelareale vor Implantation zuvor makroskopisch und histologisch überprüft und nur intakte Areale zur Implantation herangezogen wurden, konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass ein Matrixabbau zwar noch nicht erkennbar war, aber bereits begonnen hatte und damit die Knorpelqualität beeinträchtigte. Aus diesem Grund war die vereinzelt beobachtete geringe Invasion (~ eine Zelltiefe) vermutlich nicht auf die verwendeten Zellen (OASF) zurückzuführen. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist die Fähigkeit von Fibroblasten zur Gewebereparatur (Wundheilung), die, bedingt durch die glatte Schnittfläche des implantierten Knorpels, zu einem geringgradigen Einwandern in den Knorpel führen kann.

## 5.2 Wundheilung und Angiogenese

Die Migrationsfähigkeit der RASF hing nicht von der Eröffnung der murinen Haut und Implantation in das murine subkutane Gewebe sowie der nachfolgenden Wundheilung ab. Die beim Heilungsprozess sezernierten murinen Zytokine und Chemokine beeinflussten die RASF-Migration nicht. Der Einfluss der Wundheilung wurde durch die um 14 Tage zeitversetzte Implantation des ipsi- und kontralateralen Knorpels und dem damit weit fortgeschrittenen Heilungsprozess sowie in einem weiteren Experiment einer der Knorpelimplantation nachfolgenden Injektion der RASF ausgeschlossen. Der Einfluss der Wundheilung wurde ebenfalls durch Implantation des Knorpels zusammen mit RASF unter die Nierenkapsel umgangen. Die abgeschlossene Wundheilung und ein damit bestehendes, relativ intaktes Gefäßsystem im Implantat scheinen eine entscheidende Rolle bei der Migration der RASF und der damit einhergehenden Knorpeldestruktion einzunehmen. Dies wurde deutlich, wenn die RASF-enthaltenden und die RASF-freien Knorpelimplantate zeitversetzt implantiert wurden. Erfolgte das Einsetzen des RASF-freien Knorpelimplantats 14 Tage vor dem RASF-enthaltenden Implantat, so war das Ausmaß der Knorpeldestruktion im RASF-freien, kontralateralen Knorpel deutlich stärker als bei der Kontrollgruppe (Implantation nach dem „klassischen Migrationsmodell“; Abb. 6) sowie bei der Gruppe, die zuerst das RASF-enthaltende Implantat eingesetzt bekam. Obwohl die RASF zwei Wochen später in das Tier

implantiert wurden, war es ihnen möglich, durch das auf der kontralateralen Seite mittlerweile bestehende Gefäßsystem schneller zum dort eingesetzten Knorpel zu gelangen. Eine Injektion der RASF 14 Tage nach Implantation des Knorpels, also nach fortgeschrittener Wundheilung an der Implantationsstelle, resultierte ebenfalls in der starken Destruktion des Knorpels. Auch hierbei schienen die fortgeschrittene oder nahezu abgeschlossene Wundheilung sowie die zu diesem Zeitpunkt bestehende Vaskularisation der Implantate die Migration der Fibroblasten zu begünstigen. Die stärkste Destruktion des implantierten Knorpels konnte nach i.v. und s.c. Applikation der RASF gezeigt werden (Abb. 17, 18). Dadurch wurde die Hypothese bestärkt, dass die RASF-Migration durch das Lymph- und/oder Blutgefäßsystem erfolgte und die humanen Zellen in der Lage waren, aktiv an einer bestimmten Stelle das Blutgefäß wieder zu verlassen.

### 5.3 Weg der Migration

Eine weitere Bestätigung der Relevanz der Angiogenese sowie Hinweise auf die Migration durch das Gefäßsystem konnten in weiteren Experimenten erbracht werden. Die gezielte Migration sowie die nachfolgende Adhäsion der RASF an den Knorpel erfolgten unabhängig von der Art ihrer Applikation (direkte Koimplantation, zeitversetzte Implantation, Injektion). Wurden die RASF 14 Tage vor der Implantation des Knorpels injiziert, so fand ebenfalls eine gezielte Migration zum später eingesetzten Knorpel statt. Die RASF überlebten diesen Zeitraum im Tier, ohne dass es zuvor zu einem Verbleiben in anderen Organen oder in anderen Strukturen kam.

Auch im Krankheitsverlauf der RA kommt es zu einer gesteigerten Angiogenese. Zu Beginn der Proliferation des Synoviums ist eine verstärkte Gefäßbildung zu beobachten. Das entstehende hyperplastische Synovium ist stark durchblutet. Zum Einen wird dadurch die Versorgung des sich bildenden Pannus sichergestellt, zum Anderen eröffnet sich damit ein Weg aus dem im gesunden Menschen relativ geschlossenen Gelenk. Den hier lokalisierten RASF bietet sich ab diesem Zeitpunkt verstärkt die Möglichkeit zur Migration aus dem primär betroffenen Gelenk zu anderen, bislang intakten Gelenken über das Gefäßsystem.

Nach Injektion (s.c., i.v. oder i.p.) der RASF wurden die stärksten Invasionen in den Knorpel nach i.v. und s.c. Applikation der RASF beobachtet (Abb. 17, 18). Nach

direkter i.v. Applikation in das Blutgefäßsystem wurde deutlich, dass RASF die Fähigkeit besitzen, gezielt und aktiv Blutgefäße zu verlassen, um zum Knorpel zu gelangen und an ihm zu adhären. Da sich die RASF hierbei bereits im Blutkreislauf befanden, reduzierte sich die Migrationsdauer der RASF zum implantierten Knorpel und die Zeit zur Destruktion wurde somit verlängert. RASF können nach s.c. Injektion direkt oder durch Lymphgefäße in das Blutgefäßsystem gelangen. Da die i.v. Injektion bei den verwendeten 4-6 Wochen alten SCID-Mäuse schwierig ist, wurde evtl. bei der i.v. Zellapplikation nicht immer das Gefäß getroffen, so dass zwar bei jedem Tier eine starke, nicht immer aber eine massive Invasion des Knorpels zu beobachten war. Möglicherweise wurden einigen Tieren die RASF unbeabsichtigt s.c. statt i.v. verabreicht. Erstaunlicherweise waren RASF auch in der Lage, nach i.p. Injektion den Bauchraum zu verlassen, in Gefäße zu transmigrieren, um gezielt zum implantierten Knorpel zu gelangen und diesen zu invadieren.

Wurden die Zellen 14 Tage vor Einsetzen des Knorpels injiziert, so konnte eine geringere Invasion in den implantierten Knorpel im Vergleich zur nachfolgenden Injektion (Abb. 18) beobachtet werden. Obwohl die RASF sich bereits im Tier befanden, waren sie erst nach Abschluss der Wundheilung und fortgeschrittener Angiogenese in der Lage, den implantierten Knorpel zu erreichen. Weiterhin ist es möglich, dass nicht alle applizierten RASF den Zeitraum bis zum Einsetzen und Erreichen des Knorpels überlebten. Sie haben möglicherweise im Blutkreislauf nur begrenzte Möglichkeiten zur Adhäsion und ihr eigentliches Ziel, der Knorpel, war nicht erreichbar.

Die verschiedenen Applikationsarten wiesen eindeutig auf die Migration durch das Blut hin. Diese Hypothese konnte durch die histologische Analyse der verschiedenen murinen Organe bestätigt werden. Durch das Blut migrierende Zellen passierten auf ihrem Weg durch den Organismus die Milz. Da dieses Organ durch seine engmaschige Struktur ein Filtersystem des Bluts darstellt (Woolley MM und Joergenson EJ, 1958; Marx A et al., 2008), wäre bei einer Migration durch das Gefäßsystem eine hohe Anzahl der RASF zu erwarten. In der Tat wurden in jeder Milz der untersuchten SCID-Mäuse humane RASF in großer Zahl nachgewiesen. In keinem anderen Organ konnte diese hohe Anzahl humaner Zellen gezeigt werden. Nur in der Haut in der direkten Umgebung der Implantate wurden bei direkter Koimplantation der RASF und des Knorpels einzelne RASF detektiert, nicht aber im Bindegewebe oder zwischen Haut und Peritoneum (Lefèvre S et al., 2009). Die

Zellfunde in der Milz waren unabhängig von der Art der Applikation. So konnten nicht nur nach i.v. Applikation, sondern auch nach s.c. und i.p. Injektion sowie nach direkter Koimplantation der RASF diese dort detektiert werden. Anzunehmen ist, dass es den RASF in der Milz möglich war zu adhären und dort zu einem gewissen Teil zu verbleiben. Andererseits könnten die RASF z. T. durch das angeborene Immunsystem der Tiere aus dem Blutkreislauf entfernt worden sein. Dagegen wurden bspw. in der Leber oder im Herz keine humanen Zellen detektiert. Dies ist auf die relativ glatte Struktur dieser Organe zurückzuführen, wodurch keine Adhäsion möglich war. Auch die Größe der RASF könnte eine Rolle bei der hohen Zahl der Zellfunde in der Milz gespielt haben. Evtl. war es den Zellen aufgrund ihrer Größe nicht immer möglich, die Milz zu passieren. Weiterhin könnten abgestorbene RASF in der Milz vor ihrem Abbau durch Makrophagen detektiert worden sein. Unabhängig von der Ursache der Zellfunde in der Milz war die Detektion der RASF ein deutlicher Hinweis auf eine Migration durch den Blutstrom.

Diese Hinweise wurden durch Analyse des murinen Bluts bestätigt. Nach Entnahme des Bluts mit anschließender Immunzytochemie mit speziesspezifischen Antikörpern konnten humane RASF im Blut der Versuchstiere detektiert werden (Abb. 26). Um eventuelle Unspezifitäten der verwendeten Antikörper auszuschließen, wurde das Ergebnis mittels PCR verifiziert. Nach der Implantation von RASF männlicher Patienten zusammen mit Knorpel aus weiblichen Patienten in weibliche Tiere erfolgten nach 35 Tagen die Entnahme des murinen Bluts und die Isolation der DNA. Durch eine anschließende PCR mit spezifischen *primern* für das *sry*-Gen auf dem Y-Chromosom wurde der eindeutige Beweis für die humanen RASF in murinem Blut erbracht (Abb. 27). Die erhaltene Bande im Gel konnte nur von der DNA der implantierten männlichen humanen RASF stammen.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine Migration der RASF durch das Blutgefäßsystem erfolgt und RASF gezielt zu implantiertem Knorpel migrieren. Sie haben die Fähigkeit, aktiv Epithel- und Endothelzellschichten *in vivo* zu durchqueren.

Die Fähigkeit der RASF zur Transmigration konnte kürzlich *in vitro* gezeigt werden (Lefèvre S et al., 2009). Mittels einer hochsensitiven elektrophysikalischen Technik (Zak J et al., 2000) war es möglich, die Transmigration der RASF im Gegensatz zu OASF oder dermalen Fibroblasten durch eine MDCK-C7-Zellschicht (*Madin-Darby canine kidney cells*) zu demonstrieren. Eine Chondrosarkom Zell-Linie (Cal 78) diente als Positivkontrolle. Dazu wurden die zu analysierenden Zellen auf die MDCK-

C7-Zellschicht gegeben. Durch Anlegen einer Spannung und Messen des elektrischen Widerstandes konnten, je nach Zeitpunkt des Zusammenbruchs des Widerstands und damit einer erfolgten Durchquerung der MDCK-C7-Zellschicht der zu analysierenden Zellen, Rückschlüsse auf die zelluläre Transmigration gezogen werden. Durch die Fähigkeit zur Transmigration war es den RASF möglich, in den Blutkreislauf überzutreten sowie am „Ziel“, d.h. am Knorpel, wieder aus den Gefäßen auszutreten. OASF und dermale Fibroblasten waren nicht oder nur in sehr geringem Maße zur Transmigration in der Lage (Lefèvre S et al., 2009). Daher war es OASF und dermalen Fibroblasten im SCID-Mausmodell nahezu unmöglich, in Blutgefäße zu gelangen und damit über Gewebsgrenzen hinaus zu migrieren.

Der Weg der Ausbreitung der RA war bislang unbekannt. Basierend auf der Tatsache, dass RASF zur Migration über große Distanzen fähig sind, konnte mit Hilfe verschiedener Methoden der zuvor vermutete Migrationsweg der RASF über das Gefäßsystem analysiert werden. Die Migration der RASF erfolgte nicht subkutan durch das lockere Bindegewebe nach Implantation unter die Haut der SCID-Mäuse. Die RASF waren in der Lage, aktiv in Blutgefäße zu transmigrieren und durch das Blutgefäßsystem gezielt zu entfernt implantierten Knorpel zu migrieren. Auch hier sind einige Gemeinsamkeiten zur Metastasierung von Tumorzellen zu erkennen. Die verstärkte oder abgeschlossene Angiogenese schien ein entscheidender Aspekt in der Migration der RASF zu sein. Im SCID-Mausmodell konnte die Gefäßneubildung rund um und in die eingesetzten Knorpel-Trägermatrix-(RASF-) Komplexe schon sieben Tage nach deren Implantation und damit sehr früh gezeigt werden (Abb. 29). Die Transmigration der RASF in Gefäße wurde dadurch erleichtert. Durch den frühen Zeitpunkt der Gefäßneubildung konnte nicht nur die Migration vom Implantationsort weg, sondern auch der Zugang zum entfernt implantierten Knorpel vereinfacht werden.

#### **5.4 Gesunder muriner Gelenk- und Ohrknorpel**

Ziel der spezifischen RASF-Migration war der Knorpel. Außer in der Milz konnten keine signifikanten Zellzahlen in murinen Organen oder anderen Geweben detektiert werden. Dagegen wurde eine beeindruckende Anzahl an RASF am RASF-frei implantierten, kontralateralen Knorpel nach 60 Tagen im Tier gefunden. Im

Unterschied dazu konnten einzelne humane RASF nur in zwei von 18 untersuchten Tieren (11 %) im intakten murinen Gelenk detektiert werden. Ein Abbau des Knorpels war hier nach 60 Tagen nicht zu erkennen. Ein Grund dafür könnte die im gesunden Gelenk geringere Vaskularisierung sein. Durch die Gelenkkapsel stellt das Gelenk ein relativ geschlossenes System dar. Die Versorgung des Knorpels erfolgt durch Diffusion der Synovialflüssigkeit. Im SCID-Mausmodell war es den RASF daher kaum möglich, in das intakte Gelenk zu gelangen. Einen weiteren Punkt für die fehlende Detektion der RASF im murinen Gelenk stellte der Zeitfaktor dar. Es ist wahrscheinlich, dass der für die Experimente gewählte Zeitraum von ca. 60 Tagen zu kurz für eine eventuelle Migration in ein intaktes Gelenk und die Invasion in den hier vorliegenden Knorpel war. Der Verlauf der RA und das Betreffen weiterer Gelenke kann bei Patienten Monate oder sogar mehrere Jahre dauern. Der im Tiermodell dafür verhältnismäßig kurze Untersuchungszeitraum könnte einen weiteren Grund für die fehlende Detektion der RASF im murinen Gelenk darstellen.

Im Gegensatz zum Gelenkknorpel ist der murine Ohrknorpel relativ gut zugänglich, das Überwinden einer Gelenkkapsel nicht nötig und ein Zugang der RASF über Gefäße möglich. Dennoch konnte die Destruktion des Ohrknorpels nicht beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass der im Ohr vorliegende elastische Knorpel im Gegensatz zu hyalinem Gelenkknorpel aufgrund der Unterschiede in der Zusammensetzung der EZM nicht invadiert wurde oder der implantierte Knorpel den RASF einen größeren Stimulus bot, so dass sie von ihm zurückgehalten oder in verstärktem Ausmaß angezogen wurden.

## **5.5 Einfluß der Chondrozyten und der extrazellulären Matrix**

Da RASF über Gewebsgrenzen hinaus migrieren können und die Migration durch das Blutgefäßsystem gezielt zum Knorpel erfolgt, stellte sich die Frage nach Faktoren, die zum Zurückhalten oder zur Migration der RASF und damit zur Ausbreitung der RA führen.

Um auszuschließen, dass nur zuvor aus RA-Synovialgewebe isolierte und kultivierte RASF migrieren, weil sie aus ihrer normalen, wichtige physiologische Faktoren enthaltenden Umgebung isoliert wurden, erfolgte die Implantation kompletten RA-Synoviums als natürliche RASF-„Quelle“ unter die Haut der SCID-Mäuse. Die Zellen

liegen hier in wesentlich geringerer Anzahl als isoliert in der Trägermatrix vor und befinden sich in ihrem primären Umfeld. Dennoch konnte eine starke Invasion sowohl in den koimplantierten als auch in den entfernt implantierten Knorpel gezeigt werden (Abb. 19, 20). RASF adhärten am koimplantierten Knorpel, verließen aber auch ihre gewohnte Umgebung und migrierten gezielt zu entfernt implantiertem Knorpel. Sie behielten ihr destruktives Potential bei und zerstörten den Knorpel. Das RA-Synovium und die in ihm enthaltenen Faktoren übten keine zurückhaltende Wirkung auf die Fibroblasten-Migration aus.

Ein weiterer zentraler Zelltyp, der Chondrozyt, scheint bei der gezielten RASF-Migration keine Rolle zu spielen. Nach Abtöten der Chondrozyten durch zweimaliges Einfrieren der Knorpelstücke vor Implantation in SCID-Mäuse konnte kein hemmender Effekt auf die Migration, Adhäsion und Invasion der RASF an und in den Knorpel durch fehlende Chondrozyten gezeigt werden. Das Ausmaß der Invasion der Fibroblasten in den Chondrozyten-depletierten Knorpel war vergleichbar mit der Invasion in Knorpel mit vitalen Chondrozyten (Abb. 22). Eine perichondrozytäre Degradation konnte aufgrund der fehlenden Chondrozyten nicht bestimmt werden. Allerdings war die zunächst unversehrte Matrix des implantierten Knorpels nach Ablauf der 60 Tage im Tier nicht mehr in jedem Implantat intakt. Da Chondrozyten fehlten, konnten der von ihnen initiierte normale kontinuierliche Matrixumbau des Knorpels und der Erhalt der Struktur nicht stattfinden und die Matrix degradierte. Im Gegensatz zu Chondrozyten scheinen Knorpel-spezifische Faktoren von Bedeutung zu sein wie bspw. an der Knorpelmatrix anhaftende Wachstumsfaktoren oder verschiedene Matrixkomponenten der EZM. Sie stellen möglicherweise den Anreiz dar, der die RASF zum Verbleiben oder zur Migration zum Knorpel anregt.

Bei dem in die SCID-Maus implantierten Knorpel lag die EZM „frei“, da der Knorpel vor Implantation mit einem Skalpell präpariert wurde, um an allen Seiten glatte Kanten zur späteren Beurteilung der Invasion zu erhalten. Dies ist bei gesundem murinen Gelenk- und Ohrknorpel nicht der Fall. Die intakte Matrix könnte neben dem Zeitfaktor und der Zugänglichkeit einen weiteren Grund für eine fehlende Invasion der RASF in gesunde murine Gelenke darstellen. Daher wurde in die SCID-Mäuse isolierter muriner Gelenkknorpel eingesetzt, der von den implantierten RASF invadiert wurde. Da das zuvor entnommene Gelenk und damit auch der Knorpel sehr klein waren, konnte der Knorpel nicht vom Knochen isoliert und implantiert werden. Der komplette murine Hüftgelenkkopf wurde daher in die Maus eingesetzt. Im

Gegensatz zum intakten murinen Gelenk war eine Invasion der RASF insbesondere im Bereich des Knorpel-Knochen-Übergangs nachweisbar (Abb. 23b). Bei RA-Patienten kann eine beginnende Knorpeldestruktion bzw. -invasion an Mikroläsionen beanspruchter Gelenkbereiche (Owsianik WD et al., 1980) und am Knorpel-Knochen-Übergang eines Gelenks zuerst beobachtet werden. Der Knorpel scheint zugänglicher oder der Zugang zum Knorpel erleichtert zu sein. Eventuell liegt hier die Knorpelmatrix frei, so dass RASF an diesen Strukturen adhären können. Weiterhin ist der Bereich am Knochen-Knorpel-Übergang die Stelle, an der im RA-Patienten das Synovium die geringste Entfernung zum Knochen und auch zum Knorpel aufweist. Freiliegende oder zugänglichere Matrix scheint für eine Invasion der RASF in den Knorpel von essentieller Bedeutung zu sein.

Die Knorpelspezies erschien für die Invasion der RASF irrelevant, da nicht nur humaner, sondern auch muriner Knorpel invadiert und destruiert wurde. Um die Rolle des Spezieshintergrunds in einem zusätzlichen Experiment zu analysieren, wurde boviner Knorpel zusammen mit RASF in SCID-Mäuse koimplantiert. Der bovine Knorpel wurde ebenfalls von den RASF angegriffen und zerstört (Abb. 23a). Der Spezieshintergrund des Knorpels spielt eine untergeordnete bzw. keine Rolle, da die Zusammensetzung der EZM des Knorpels verschiedener Spezies konserviert zu sein scheint. Es ist anzunehmen, dass v. a. die freiliegende Knorpelmatrix, z. B. am Knochen-Knorpel-Übergang oder durch Mikroläsionen am Knorpel, bzw. verschiedene Matrix-Komponenten oder Matrix-assoziierte Proteine in der EZM (Wachstumsfaktoren, Chemokine) von Bedeutung ist.

Zur Bestätigung der erleichterten RASF-Invasion in den Knorpel mit zugänglicher Matrix wurde Kollagenase in das intakte murine Gelenk der SCID-Mäuse injiziert. Direkt im Anschluß erfolgte die s.c. Applikation der RASF. Nach wenigen Tagen konnte ein durch die Kollagenase induzierter Gelenk- bzw. Knorpelabbau aufgrund des veränderten Gangbildes und der damit verbundenen Entlastung des entsprechenden Beins der Tiere diagnostiziert werden. Die induzierte Zerstörung wurde am Ende des Versuchszeitraumes durch Analyse der Gelenkknorpel der Kontrolltiere histologisch bestätigt (Abb. 24). Mittels Kollagenasebehandlung wurde das Gelenk und v. a. die Matrix des murinen artikulären Knorpels zugänglich gemacht. Auch hier konnte verdeutlicht werden, dass der Zugang zur Knorpelmatrix eine wichtige Voraussetzung für einen nachfolgenden RASF-medierten

Knorpelabbau ist. Nach paralleler Injektion der RASF konnte schon beim ersten Analysezeitpunkt (nach 28 Tagen) des mit Kollagenase behandelten Gelenks eine deutliche Invasion durch humane Zellen gezeigt werden (Abb. 25c). Diese schwerwiegende invasive Zerstörung des Gelenks ist untypisch für das eigentlich in der Arthroseforschung verwendete Tiermodell. Überraschenderweise erfolgte die Zerstörung des Gelenks hier, wie bei RA-Patienten sowie beim isoliert implantierten murinen Gelenkkopf am Knorpel-Knochen-Übergang. Es kam zu starken Erosionen des Knorpels, aber auch des Knochens. Die Knorpeloberfläche wurde nahezu vollständig von den RASF angegriffen und zum Teil stark zerstört. Beeindruckend war auch die tiefe RASF-vermittelte Invasion in den Knochen, ausgehend von der Knorpel-Knochen-Grenze. Die *in vivo* Versuche wurden durch *in vitro* Ergebnisse unterstützt, die in Kooperation durchgeführt wurden (Lefèvre S et al., 2009). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass für eine erfolgreiche Adhäsion der RASF an die Knorpelmatrix die EZM freiliegen muss bzw. Vorschädigungen nötig sind. Hierfür wurden isolierte Knorpelstücke vier Stunden lang mit Kollagenase behandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von RASF oder OASF. Die Auswertung der Adhäsion erfolgte nach insgesamt 14 Stunden. In Kontrollansätzen mit nicht-behandeltem Knorpel konnte gezeigt werden, dass OASF nicht und RASF nur in sehr geringem Maß an nicht-geschädigtem Knorpel adhärten. Die Kollagenasebehandlung der Knorpelstücke führte zu einem signifikanten Anstieg der adhärierenden Zellen. Dabei konnten deutlich mehr RASF als OASF am geschädigten Knorpel gezählt werden.

## 5.6 Chemotaktische Effekte der Knorpelmatrix

Zur genaueren Analyse der Bedeutung der Knorpelmatrix bei der RASF-Migration wurde die chemotaktische Wirkung der isolierten Matrix in der Boyden-Kammer untersucht. Dafür wurde fein gemahlener gesunder humaner Knorpel als Chemoattraktans verwendet. Im gemahlene Knorpel befanden sich aufgrund der Vorbehandlung in der Kugelmühle in Verbindung mit flüssigem Stickstoff erneut keine vitalen intakten Chondrozyten, jedoch teilweise die von ihnen sezernierten Faktoren und Zellbestandteile (Geyer M et al., 2009). Mit zunehmender Konzentration des gemahlene Knorpels (10 µg/µl, 50 µg/µl, 100 µg/µl) konnte eine dosisabhängige

gesteigerte gerichtete Migration der RASF zum gemahlene Knorpel hin beobachtet werden (Abb. 31). Die Komponenten der Knorpelmatrix, aber auch an der Matrix anhaftende Faktoren, scheinen für die RASF-Migration entscheidend zu sein. Um dieses Ergebnis weiter zu analysieren, wurden einzelne Matrixbestandteile im Hinblick auf ihre Wirkung auf die RASF-Migration untersucht. Durch Beschichtung der Trägermatrices mit einzelnen Matrixbestandteilen oder Kombinationen vor Implantation in die SCID-Mäuse konnte gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren für die Migration der RASF von Bedeutung sind. War die den Knorpel enthaltende Kunststoff-Trägermatrix mit einer Wachstumsfaktor-reduzierten Matrix beschichtet, so erfolgte eine deutlich reduzierte Invasion in den Knorpel oder sogar eine Migration der RASF weg von dieser Matrix und damit weg vom inserierten Knorpel (Abb. 32). Es kam erst gar nicht zur Invasion oder Migration der RASF zum entfernt implantierten Knorpel, wenn sein Trägerschwamm mit der Wachstumsfaktor-reduzierten Matrix beschichtet war. Dagegen konnte bei Verwendung der einzelnen EZM-Bestandteile Aggrekan, Fibronectin, Kollagen Typ II oder verschiedenen Kombinationen (BD Hydrogel, BD Matrigel) in diesem Versuchsansatz kein entscheidender Einfluss auf die Migration und/oder Adhäsion der RASF an den Knorpel beobachtet werden. Bei diesen Bestandteilen konnte keine Aussage über deren Wirkung auf das Migrations- bzw. Invasionsverhalten der RASF getroffen werden. Möglich ist, dass bspw. bei der Beschichtung mit Fibronectin die RASF an der Trägermatrix selbst adhären, da Fibronectin auf RASF chemotaktisch wirkt (Wang AZ et al., 1994) und häufig als Positivkontrolle bei chemotaktischen Analysen eingesetzt wird. Es konnte daher keine Aussage über die Wirkung im Hinblick auf die RASF-Migration und Invasion in den Knorpel *in vivo* geliefert werden.

## 5.7 Experimentelle therapeutische Intervention

Die Adhäsion der RASF an Gefäßwände sowie an Knorpel spielt eine wichtige Rolle in der RA, da sie der erste Schritt ist, aus dem zunächst die Transmigration in die Gefäße sowie später die Knorpeldestruktion resultiert. Im RA-Gewebe sind Adhäsionsmoleküle (z. B. VCAM-1, Integrine) verstärkt exprimiert und sind nicht nur bei der Adhäsion der RASF an Knorpel, Matrix oder andere Zellen von Bedeutung (Agarwal SK und Brenner MB, 2006). Sie könnten wichtige Mediatoren bei der

Transmigration der RASF in Gefäße sowie der aktiven Invasion in den Knorpel darstellen. Die Charakterisierung und anschließende Blockade dieser Adhäsionsmoleküle stellte ein weiteres Ziel bei der Analyse der Mechanismen RASF-Migration dar. Durch Hemmung des VCAM-1 durch neutralisierende anti-humane VCAM-1-Antikörper konnte *in vitro* bereits eine Reduktion der ungerichteten Migration (Abb. 33) gezeigt werden. Das auf synovialen Fibroblasten und Endothelzellen exprimierte VCAM-1 bindet an den Rezeptor VLA-4 (Müller-Ladner U et al., 1997; Silverman MD et al., 2007). Dadurch werden Zell-Zell-Kontakte sowie Migration und Transmigration durch Gefäße ermöglicht. Auch die Hemmung der Adhäsion der RASF nach Behandlung mit anti-VCAM-1-Antikörpern konnte *in vitro* kürzlich demonstriert werden (Lefèvre S et al., 2009). Dabei wurden 3000 mit anti-VCAM-1-Antikörpern behandelte und gefärbte RASF auf eine HUVEC-Zellschicht (*human umbilical vein endothelial cells*) gegeben und eine Spannung angelegt. Nach vier Minuten wurden die adhärenen Zellen ausgezählt. Verglichen mit unbehandelten RASF war die Adhäsion der behandelten Zellen reduziert. Die Zelladhäsion konnte durch VCAM-1-Blockade *in vitro* reduziert werden. Ziel einer gelenkprotektiven Therapie wäre die Hemmung der VCAM-1-vermittelten Kontakte *in vivo*. Allerdings konnte hier keine Reduktion der RASF-Migration erreicht werden. Eine Hemmung der RASF-medierte Knorpelinvasion im SCID-Maus Modell konnte nach regelmäßiger Injektion anti-humaner VCAM-1-Antikörper nicht erzielt werden. Da es sich beim SCID-Mausmodell der RA um ein murin-humanes System handelt, konnte durch den verwendeten anti-humanen Antikörper wahrscheinlich murines VCAM-1 auf murinen Endothelzellen nicht inhibiert werden, so dass dieses nach wie vor aktiv war. Eine Adhäsion sowie die folgende Transmigration der RASF waren weiterhin möglich und der entfernt implantierte Knorpel wurde invadiert. Nicht nur VCAM-1 ist für die vaskuläre Transmigration essentiell; auch ICAM-1 spielt bei diesem Prozess eine wichtige Rolle. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibition von ICAM-1 zu einer Reduktion der Leukozytenmigration *in vitro* und *in vivo* führt (Reiss Y und Engelhardt B, 1999; Turowski P et al., 2005). Da auch RASF ICAM-1 exprimieren (McCourt PA et al., 1994), könnte die Präsenz dieses und anderer Adhäsionsmoleküle zur ausbleibenden Hemmung der transendothelialen RASF-Migration beigetragen haben. Eine weitere Möglichkeit für den fehlenden Effekt *in vivo* stellte eine zu geringe Dosierung der Antikörper dar, da diese zuvor noch nie *in vivo* verwendet oder getestet wurden. Die gewählte Konzentration

entsprach der Antikörper-Konzentration der *in vitro* erfolgreich verwendeten, die Adhäsion hemmenden Dosis (Lefèvre S et al., 2009). Auch eine Wiederholung des Experiments mit einer 20% höheren Antikörper-Dosierung resultierte nicht in der Reduktion der Knorpelinvasion.

Die Blockade von  $\text{TNF}\alpha$  stellte einen weiteren möglichen Ansatzpunkt in der Hemmung der die Migration bedingenden Mechanismen dar. Antikörper gegen  $\text{TNF}\alpha$  werden heute in der Therapie der RA eingesetzt. Daher wurde *in vitro* und *in vivo* untersucht, ob diese Antikörper möglicherweise einen hemmenden Einfluss auf die Migration der RASF haben. *In vitro* konnte mittels des *scrape motility assays* eine leichte, nicht signifikante Reduktion der ungerichteten Migration der RASF nach Adalimumab-Zugabe beobachtet werden (Abb. 33). *In vivo* zeigte die Applikation der anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörper keinen protektiven Effekt. Auch andere in der RA-Behandlung verwendete Inhibitoren (z. B. Tocilizumab) zeigten in Hinblick auf die RASF-Migration und -Invasion keine Wirkung. Im Tiermodell konnte daher bislang kein hemmender Einfluss auf die RASF beobachtet werden.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Blockade von  $\text{TNF}\alpha$  in der Therapie von RA-Patienten zwar die Entzündung, jedoch nicht die RASF-vermittelte Ausbreitung der RA hemmen kann.

## 5.8 Potentielle therapeutische Ziele

Um weitere mögliche therapeutische Ziele zu identifizieren, wurden adhäsionsrelevante Moleküle an der Invasionszone in den Implantaten analysiert. Integrine spielen eine zentrale Rolle bei der Zelladhäsion. Im SCID-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass bestimmte Integrine von RASF an der Invasionszone in den Knorpel exprimiert werden. Da Integrine nicht nur als Adhäsionsmoleküle, sondern ebenfalls als Signalrezeptoren fungieren, könnten sie im Verlauf der RA eine wichtige Rolle einnehmen (Hynes RO, 1992; Giancotti FG und Ruoslahti E, 1999; Hynes RO, 2002). Sie tragen zur Aktivierung der RASF bei, was zum Zellwachstum sowie zu einer gesteigerten Motilität führt (Galbraith CG et al., 2007). Durch die Charakterisierung der an der RASF-Adhäsion an den Knorpel beteiligten Integrine könnten durch eine gezielte Hemmung die Knorpelinvasion (Lowin T et al, 2009), aber auch die Migration der RASF gehemmt werden. Da die auf invadierenden RASF

nachgewiesenen Untereinheiten  $\alpha_5$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_5$  und  $\alpha_v$  auch auf weiteren Zellen exprimiert werden, ist eine spezielle Hemmung dieser Adhäsionsmoleküle auf RASF schwierig. Eine Inhibition könnte nicht nur in der gezielten Blockade der Integrin-Untereinheiten auf RASF resultieren, sondern auch andere Zelltypen betreffen.

Eine lokale oder systemische Hemmung verschiedener Adhäsionsmoleküle könnte die Adhäsion, Transmigration und Invasion der RASF reduzieren.

## 5.9 Subpopulationen

Eine weitere wichtige Erkenntnis im Verlauf der Analyse des Migrationspotentials der RASF war, dass es sich bei der Zell-Population der RASF eines Patienten um eine heterogene Population handelt. Die Subpopulationen scheinen sich in ihrem Migrationspotential zu unterscheiden. Ein Teil der implantierten RASF verließ in den ersten 14 Tagen nach Implantation in die SCID-Maus den Implantationsort und migrierte (Tab. 14). Wurde nach dieser Zeit der mit RASF koimplantierte Knorpel-Schwamm-Komplex aus einem Tier in eine neue SCID-Maus transferiert und auf der kontralateralen Seite ein RASF-freies Knorpelstück eingesetzt, so verblieben die zuvor nicht ausgewanderten RASF am mit ihnen implantierten Knorpel und invadierten ihn. Eine Migration durch den murinen Körper zum kontralateral implantierten Knorpel erfolgte nicht mehr und eine Invasion des entfernt implantierten Knorpels war nicht nachweisbar (Tab. 14). Wurde nach 14 Tagen das kontralaterale RASF-freie Implantat durch ein neues ersetzt, so konnte an diesem nach ca. 55 Tagen im Tier eine Invasion und Destruktion des Knorpels beobachtet werden. Vermutlich befanden sich die RASF am Tag des Implantatwechsels bereits im Blutgefäßsystem und migrierten nach Abschluss der Wundheilung und Gefäßneubildung zum neu implantierten Knorpel. Nach 14 Tagen waren die gewanderten RASF bereits am kontralateral implantierten Knorpel zu finden, eine Invasion hatte nach diesem kurzen Zeitraum jedoch noch nicht stattgefunden.

Auch Primärtumore bestehen aus einer heterogenen Zellpopulation, die sich hinsichtlich ihrer Charakteristiken unterscheiden. Dazu gehört bspw. das Potential zur Metastasierung und Invasion (Fidler IJ et al., 2007). Somit sind Parallelen zur RA zu erkennen. Auf diesem Experiment aufbauende Versuche könnten weiteren Aufschluss über die Subpopulationen in der RA geben. Dabei könnten migrierte und

nicht-migrierende RASF aus den entsprechenden entnommenen Implantaten isoliert, rekultiviert und genauer analysiert und charakterisiert werden. Eine Möglichkeit wäre die Analyse potentiell unterschiedlicher Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen.

In der vorliegenden Arbeit wurden bisher offene Fragen zur Ausbreitung der RA innerhalb eines Gelenks sowie zwischen Gelenken beantwortet. Weiterhin wurden die Effektorzellen und Mechanismen, die zu der charakteristischen klinischen Progression der RA führen, untersucht. RASF sind in der Lage, aus einem von der RA betroffenen Gelenk zu emigrieren (dargestellt durch ein mit RASF implantiertes Knorpelstück), in das Blutgefäßsystem zu transmigrieren, an einem bestimmten Punkt das Blutgefäßsystem wieder zu verlassen und in ein gesundes Gelenk zu migrieren (dargestellt durch das RASF-frei implantierte Knorpelstück), um dort anschließend artikulären Knorpel zu invadieren. Dabei sind die Spezies des Knorpels sowie die Vitalität der Chondrozyten nicht entscheidend. Vielmehr kommt der freiliegenden Knorpelmatrix und ihren Komponenten eine entscheidende Rolle zu. Adhäsionsmoleküle wie z. B. VCAM-1 und Integrine sind hierbei von Bedeutung und mögliche Angriffspunkte für künftige gelenkprotektive therapeutische Strategien.

RASF nehmen in der Pathophysiologie der RA eine zentrale Rolle ein. Sie tragen aufgrund ihres einzigartigen aktivierten Phänotyps, der offenbar durch ein erhöhtes Migrationspotential gekennzeichnet ist, in großem Maße zur Ausbreitung der RA bei

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist primär eine chronische Entzündung der Gelenke, die in ihrem Verlauf zur Knorpel- und Knochendestruktion führt. Die Erkrankung beginnt in einzelnen Gelenken, breitet sich jedoch zunehmend aus und kann alle Gelenke betreffen. Der Weg der Ausbreitung sowie die zugrundeliegenden Mechanismen waren bisher nicht bekannt. Aktivierete synoviale Fibroblasten (SF) nehmen in der RA eine zentrale Rolle ein. Sie adhären aktiv am Gelenkknorpel, wandern in ihn ein und zerstören ihn, unter anderem durch die Produktion verschiedener Matrixmetalloproteinasen. Bislang konnte nachgewiesen werden, dass RASF zur Migration über kurze Distanzen und innerhalb eines Gelenks in der Lage sind. Über eine Migration zu entfernt gelegenen Arealen oder anderen Gelenken konnte bisher keine Aussage getroffen werden.

In dieser Arbeit konnte erstmals die Migration der RASF über weite Distanzen gezeigt werden. Nach subkutaner Implantation eines gesunden humanen Knorpelstücks zusammen mit RASF in SCID-Mäuse sowie der Implantation eines Knorpelstücks ohne RASF auf der gegenüberliegenden Seite konnte nach 60 Tagen nicht nur die Destruktion des mit RASF koimplantierten Knorpels beobachtet werden, sondern auch die Zerstörung des entfernt eingesetzten Knorpelstücks. Demnach besitzen die RASF die Fähigkeit, über weite Distanzen durch das Blutgefäßsystem in einem (murinen) Organismus zu migrieren. Die Wundheilung selbst übte keinen Einfluss auf die gezielte Migration der Fibroblasten aus. Allerdings wurde durch eine zu einem frühen Zeitpunkt nahezu abgeschlossene Angiogenese am und im Implantat der Zugang zum Blutgefäßsystem erleichtert. Es stellte sich heraus, dass RASF zur Transmigration in Gefäße in der Lage sind und sie das Gefäßsystem an einer bestimmten Stelle wieder verlassen können. Synoviale Fibroblasten aus Patienten mit Osteoarthrose oder humane dermale Fibroblasten zeigen dieses transmigratorische und knorpeldestruktive Verhalten nicht.

Die Migration der RASF erfolgte unabhängig von der Vitalität und Spezies des implantierten Knorpels. Vitale Chondrozyten scheinen keinen Einfluss auf die gezielte RASF-Migration auszuüben, da auch die Implantation Chondrozyten-depletierten Knorpels in die SCID-Maus zur Invasion des Knorpels führte. Auch

boviner sowie muriner Knorpel von Spendertieren wurde zerstört. Dabei erfolgte die Einwanderung der RASF in den murinen Knorpel an der Knorpel-Knochen-Grenze. Dieses Verhalten kann auch bei RA-Patienten beobachtet werden. Im gesunden murinen Gelenk konnten dagegen keine RASF bzw. keine Zerstörung des Knorpels nachgewiesen werden. Der Versuchszeitraum von 60 Tagen sowie das intakte geschlossene Gelenk könnten hier die limitierenden Faktoren darstellen. Die Invasion und Zerstörung des murinen Gelenkknorpels erfolgte jedoch, wenn die Gelenke zuvor mit Kollagenase behandelt wurden und nachweislich Mikroläsionen und damit einen Zugang zur Knorpelmatrix aufwiesen. Die beobachtete Zerstörung des Knorpels und des Knochens konnte wiederum prominent an der Knorpel-Knochen-Grenze gezeigt werden. Die freiliegende Matrix des Knorpels sowie Adhäsionsmoleküle scheinen im Gegensatz zum Spezies-Hintergrund sowie zur Vitalität der Chondrozyten von Bedeutung zu sein. Nach Analyse isolierter und definierter Bestandteile der extrazellulären Matrix konnte gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle spielen. Nur hier erfolgte *in vitro* die gerichtete Migration der RASF. Weiterhin scheint es sich bei der RASF-Population eines Patienten um eine heterogene Population mit unterschiedlichem Migrationsverhalten zu handeln. Die Hauptmigration erfolgt dabei in den ersten 14 Tagen nach Implantation. Erste therapeutische Ansätze zur Inhibition der Migration der RASF zeigten, dass zwar die ungerichtete, jedoch nicht die gerichtete Bewegung gehemmt werden kann. Im Tiermodell wurde bisher keine erfolgreiche Inhibition der Migration und damit ein Unterbleiben der Knorpeldestruktion erzielt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beantworten bislang offene Fragen zur Ausbreitung der rheumatoiden Arthritis, zu Effektorzellen sowie zu Mechanismen, die zu den charakteristischen klinischen Eigenschaften der rheumatoiden Arthritis führen. Diese Arbeit beweist zum ersten Mal, dass rheumatoide synoviale Fibroblasten als zentrale Zellen maßgeblich nicht nur zur Zerstörung des Gelenks beitragen, sondern auch für die Ausbreitung der Erkrankung bei betroffenen Patienten durch ihr einmaliges Migrationspotential verantwortlich sind.

## 7 LITERATUR

Abeles AM und Pillinger MH. The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis: cartilage destruction and the regulation of matrix metalloproteinases. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2006; 64: 20-24

Abramson SB und Amin A. Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage. *Rheumatology* 2002; 41: 972-980

Agarwal SK, Brenner MB. Role of adhesion molecules in synovial inflammation. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18: 268-276

Aida Y, Maeno M, Suzuki N, Shiratsuchi H, Motohashi M, Matsumura H. The effect of IL-1beta on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrocytes. *Life Sci* 2005; 77: 3210-3221

Aidinis V, Plows D, Haralambous S, Armaka M, Papadopoulos P, Kanaki MZ, Koczan D, Thiesen HJ, Kollias G. Functional analysis of an arthritogenic synovial fibroblast. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: R140-157

Akhavani MA, Madden L, Buyschaert I, Sivakumar B, Kang N, Paleolog EM. Hypoxia regulates angiogenesis and synovial cell migration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R64-75

Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 783-836

Arend WP. IL-1 antagonism in inflammatory arthritis. *Lancet* 1993; 341: 155-156

Arend WP. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 45: 101-106

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31:315-324

Ben-Horin S und Bank I. The role of very late antigen-1 in immune-mediated inflammation. *Clin Immunol* 2004; 113: 119-129

Berton G und Lowell CA. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal* 1999; 11: 621-635

Beurden HE, Snoek PA, Hoff JW, Torensma R, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. In vitro migration and adhesion of fibroblasts from different phases of palatal wound healing. *Wound Repair Regen* 2006; 14: 66-71

Bingham CO 3rd. Emerging therapeutics for rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2008; 66: 210-215

- Blaney Davidson EN, Vitters EL, van Beuningen HM, van de Loo FA, van den Berg WB, van der Kraan PM. Resemblance of osteophytes in experimental osteoarthritis to transforming growth factor beta-induced osteophytes: limited role of bone morphogenetic protein in early osteoarthritic osteophyte formation. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 4065-4073
- Bodolay E, Koch AE, Kim J, Szegedi G, Szekanecz Z. Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases. *J Cell Mol Med* 2002; 6: 357-376
- Borden P, Solymar D, Sucharczuk A, Lindman B, Cannon P, Heller RA. Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes. *J Biol Chem* 1996; 271:23577-23581
- Bosma GC, Fried M, Custer RP, Carroll A, Gibson DM, Bosma MJ. Evidence of functional lymphocytes in some (leaky) scid mice. *J Exp Med* 1988; 167: 1016-1033
- Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 1962; 115: 453-466
- Brentano F, Kyburz D, Gay S. Toll-like receptors and rheumatoid arthritis. *Methods Mol Biol* 2009; 517: 329-343
- Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 1994; 264: 569-571
- Brühl H, Mack M, Niedermeier M, Lochbaum D, Schölmerich J, Straub RH. Functional expression of the chemokine receptor CCR7 on fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology* 2008; 47: 1771-1774
- Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol* 2001; 22: 199-204
- Buckwalter JA und Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 1998; 47: 477-486
- Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci* 2006; 11: 529-543
- Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; 67:1033-1036
- Cha HS, Rosengren S, Boyle DL, Firestein GS. PUMA regulation and proapoptotic effects in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 587-592
- Choy EH und Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001; 344: 907-916
- Clements KM, Bee ZC, Crossingham GV, Adams MA, Sharif M. How severe must repetitive loading be to kill chondrocytes in articular cartilage? *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9: 499-507
- Cotran RS und Pober JS. Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity and vascular injury. *J Am Soc Nephrol* 1990; 1: 225-235

Darby IA und Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol* 2007; 257: 143-179

Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996; 87: 1161-1169

Distler JH, Jüngel A, Huber LC, Seemayer CA, Reich CF 3rd, Gay RE, Michel BA, Fontana F, Gay S, Pisetsky DS, Distler O. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *PNAS* 2005; 102: 2892-2897

Dooley S, Herlitzka I, Hanselmann R, Ermis A, Henn W, Remberger K, Hopf, T, Welter C. Constitutive expression of c-fos and c-jun, overexpression of ets-2, and reduced expression of metastasis suppressor gene nm23-H1 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 298-304

Eckes B, Kessler D, Aumailley M, Krieg T. Interactions of fibroblasts with the extracellular matrix: implications for the understanding of fibrosis. *Springer Semin Immunopathol* 1999; 21: 415-429

el-Gabalawy H. The preclinical stages of RA: lessons from human studies and animal models. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2009; 23: 49-58

Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyi S, Hemler ME, Lobb RR. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 1990; 60: 577-584

Ermann J, Fathman GC. Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. *Nat Immunol* 2001; 2: 759-761

Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 2002; 4: 30-35

Fassbender HG. Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Coll Relat Res* 1983; 3: 141-155

Fassbender HG. What destroys the joint in rheumatoid arthritis? *Arch Orthop Trauma Surg* 1998; 117: 2-7

Fearon U, Griosios K, Fraser A, Reece R, Emery P, Jones PF, Veale DJ. Angiopoietins, growth factors, and vascular morphology in early arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30: 260-268

Feldmann M. Pathogenesis of arthritis: recent research progress. *Nat Immunol* 2001; 2: 771-773

Ffrench-Constant C und Colognato H. Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 678-686

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'see and soil' hypothesis revisited. *Nature Rev Cancer* 2003; 3: 453-458

Fidler IJ, Kim SJ, Langley RR. The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis. *J Cell Biochem* 2007; 101: 927-936

- Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 1995; 270: 1500-1502
- Galbraith CG, Yamada KM, Galbraith JA. Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites. *Science* 2007; 315: 992-995
- García-Vicuña R, Gómez-Gaviro MV, Domínguez-Luis MJ, Pec MK, González-Alvaro I, Alvaro-Gracia JM, Díaz-González F. CC and CXC chemokine receptors mediate migration, proliferation, and matrix metalloproteinase production by fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3866-3877
- Gay S, Gay RE, Koopman WJ. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis* 1993; 52 Suppl 1: S39-47
- Geyer M, Grässel S, Straub RH, Schett G, Dinser R, Grifka J, Gay S, Neumann E, Müller-Ladner U. Differential transcriptome analysis of intraarticular lesional vs intact cartilage reveals new candidate genes in osteoarthritis pathophysiology. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17: 328-335
- Giancotti FG und Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285: 1028-1032
- Ginsberg MH, Partridge A, Shattil SJ. Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 509-516
- Goldring SR und Goldring MB. Clinical aspects, pathology and pathophysiology of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006; 6: 376-378
- Goldring MB and Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 2007; 213: 626-634
- Gravallese EM. Bone destruction in arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: ii84-ii86
- Hartung K und Seelig HP. Laboratory diagnostics of systemic autoimmune diseases. Part II: rheumatoid arthritis and vasculopathies. *Z Rheumatol* 2007; 66: 225-237
- Hashimoto A, Matsui T, Tanaka S, Ishikawa A, Endo H, Hirohata S, Kondo H, Neumann E, Turner IH, Müller-Ladner U. Laser-mediated microdissection for analysis of gene expression in synovial tissue. *Mod Rheumatol* 2007a; 17: 185-190
- Hashimoto A, Turner IH, Bohle RM, Gaumann A, Manetti M, Distler O, Steinmeyer J, Ulfgren AK, Schulz A, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E. Analysis of vascular gene expression in arthritic synovium by laser-mediated microdissection. *Arthritis Rheum* 2007b; 56: 1094-1105
- Hartlapp I, Abe R, Saeed RW, Peng T, Voelter W, Bucala R, Metz CN. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *FASEB J* 2001; 15: 2215-2224
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 2000; 148: 779-790
- Hogg N, Laschinger M, Giles K, McDowall A. T-cell integrins: more than just sticking points. *J Cell Sci* 2003; 116: 4695-4705

- Huber LC, Distler O, Turner I, Gay RE, Gay S, Pap T. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2006; 45: 669-675
- Hübner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fässler R, Werner S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine* 1996; 8: 548-556
- Hunter KW, Crawford NP, Alsarraj J. Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res* 2008; 10: S2
- Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25
- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673-687
- Ishikawa H, Hirata S, Andoh Y, Kubo H, Nakagawa N, Nishibayashi Y, Mizuno K. An immunohistochemical and immunoelectron microscopic study of adhesion molecules in synovial pannus formation in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1996; 16: 53-60
- 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 RA. *Mod Rheumatol* 2001; 11: 145-150
- Karouzakis E, Neidhart M, Gay RE, Gay S. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol Lett* 2006; 106: 8-13
- Kim JB, Islam S, Kim YJ, Prudoff RS, Sass KM, Wheelock MJ, Johnson KR. N-Cadherin extracellular repeat 4 mediates epithelial to mesenchymal transition and increased motility. *J Cell Biol* 2000; 151: 1193-1206
- Kitagawa A, Miura Y, Saura R, Mitani M, Ishikawa H, Hashiramoto A, Yoshiya S, Shiozawa S, Kurosaka M. Anchorage on fibronectin via VLA-5 (alpha5beta1 integrin) protects rheumatoid synovial cells from Fas-induced apoptosis. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 721-727
- Knedla A, Riepl B, Lefèvre S, Kistella S, Grifka J, Straub RH, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U, Neumann E. The therapeutic use of osmotic minipumps in the severe combined immunodeficiency (SCID) mouse model for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006; 68: 124-129
- Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, Pope RM, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1994; 152: 4149-4156
- Koch AE. Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 951-962
- Kontny E, Ziolkowska M, Dudzińska E, Filipowicz-Sosnowska A, Ryzewska A. Modified expression of c-Fos and c-Jun proteins and production of interleukin-1 beta in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13: 51-57
- Konttinen YT, Li TF, Hukkanen M, Ma J, Xu JW, Virtanen I. Fibroblast biology. Signals targeting the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res* 2000; 2: 348-355
- Korb A, Pavenstädt H, Pap T. Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis* 2009; 14: 447-454

- Kriegsmann J, Keyszer GM, Geiler T, Bräuer R, Gay RE, Gay S. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 mRNA and protein in rheumatoid synovium demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Lab Invest* 1995; 72: 209-214
- Kuenzler P, Kuchen S, Rihosková V, Michel BA, Gay RE, Neidhart M, Gay S, Seemayer CA. Induction of p16 at sites of cartilage invasion in the SCID mouse coimplantation model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2069-2073
- Lafyatis R, Remmers EF, Roberts AB, Yocum DE, Sporn MB, Wilder RL. Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids. *J Clin Invest* 1989; 83: 1267-1276
- Langley RR und Fidler IJ. Tumor cell-organ microenvironment in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev* 2007; 28: 297-321
- Le NT, Xue M, Castelnoble LA, Jackson CJ. The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation. *Front Biosci* 2007; 12: 1475-1487
- Lee DM und Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001; 358: 903-911
- Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnäker EM, Turner IH, Robbins PD, Evans CH, Stürz H, Steinmeyer J, Gay S, Schölmerich J, Pap T, Müller-Ladner U, Neumann E. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med* 2009; 15: 1414-1420
- Li P, Sanz I, O'Keefe RJ, Schwarz EM. NF-kappa B regulates VCAM-1 expression on fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 2000; 164: 5990-5997
- Lowin T, Straub RH, Neumann E, Bosserhoff A, Vogel C, Moissl C, Anders S, Müller-Ladner U, Schedel J. Glucocorticoids increase  $\alpha 5$  integrin expression and adhesion of synovial fibroblasts but inhibit ERK signaling, migration, and cartilage invasion. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 3623-3632
- Ma Y und Pope RM. The role of macrophages in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 569-580
- Maini RN, Elliott M, Brennan FM, Williams RO, Feldmann M. Targeting TNF alpha for the therapy of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1994; 12: S63-66
- Marlor CW, Webb DL, Bombara MP, Greve JM, Blue ML. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in fibroblastlike synoviocytes after stimulation with tumor necrosis factor. *Am J Pathol* 1992; 140: 1055-1060
- Marok R, Winyard PG, Coumbe A, Kus ML, Gaffney K, Blades S, Mapp PI, Morris CJ, Blake DR, Kaltschmidt C, Baeuerle PA. Activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB in human inflamed synovial tissue. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 583-591
- Martin P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276: 75-81
- Marx A, Hartmann M, Zettl A, Müller-Hermelink HK, Rüdiger T. Functional splenic pathology and differential diagnosis in splenectomy. *Pathologe* 2008; 29: 109-114

- Matsumoto S, Müller-Ladner U, Gay RE, Nishioka K, Gay S. Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 1996; 23: 1345-1352
- McCourt PA, Ek B, Forsberg N, Gustafson S. Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan. *J Biol Chem* 1994; 269: 30081-30084
- McCawley LJ und Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 534-540
- Moore BB, Kolodsick JE, Thannickal VJ, Cooke K, Moore TA, Hogaboam C, Wilke CA, Toews GB. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am J Pathol* 2005; 166: 675-684
- Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol* 2005; 115: 118-128
- Morales-Ducret J, Wayner E, Elices MJ, Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Firestein GS. Alpha 4/beta 1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 1992; 149: 1424-1431
- Morel JC, Park CC, Zhu K, Kumar P, Ruth JH, Koch AE. Signal transduction pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblast interleukin-18-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. *J Biol Chem* 2002; 277: 34679-34691
- Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays* 1995; 17: 1039-1048
- Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Gay RE, Gay S. Oncogenes in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1995; 21: 675-690
- Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, Gay S. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* 1996; 149:1607-1615
- Müller-Ladner U, Roberts CR, Franklin BN, Gay RE, Robbins PD, Evans CH, Gay S. Human IL-1Ra gene transfer into human synovial fibroblasts is chondroprotective. *J Immunol* 1997; 158:3492-3498
- 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; 24: 1873-1880
- Müller-Ladner U und Nishioka K. p53 in rheumatoid arthritis: friend or foe? *Arthritis Res* 2000; 2: 175-278
- Müller-Ladner U und Gay S. MMPs and rheumatoid synovial fibroblasts: Siamese twins in joint destruction? *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 957-959
- Müller-Ladner U, 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; 1: 102-110

- Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: 223-232
- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 562-573
- Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanaka Y. Induction of RANKL expression and osteoclast maturation by the binding of fibroblast growth factor 2 to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2450-2458
- Neidhart M, Zaucke F, von Knoch R, Jüngel A, Michel BA, Gay RE, Gay S. Galectin-3 is induced in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after adhesion to cartilage oligomeric matrix protein. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 419-424
- Neu CP, Komvopoulos K, Reddi AH. The interface of functional biotribology and regenerative medicine in synovial joints. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; 14: 235-247
- 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; 9: 1508-19
- Neumann E, Riepl B, Knedla A, Lefèvre S, Tarner IH, Grifka J, Steinmeyer J, Schölmerich J, Gay S, Müller-Ladner U. Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 2009; in press
- Osborn L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 1989; 62: 3-6
- Owsianik WD, Kundi A, Whitehead JN, Kraag GR, Goldsmith C. Radiological articular involvement in the dominant hand in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1980; 39: 508-510
- Panush RS, Kramer N, Rosenstein ED. Assessment and prognosis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1992; 4: 355-364
- Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000a; 2: 361-367
- Pap T, Shigeyama Y, Kuchen S, Fernihough JK, Simmen B, Gay RE, Billingham M, Gay S. Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000b; 43: 1226-1232
- Pap T, van der Laan WH, Aupperle KR, Gay RE, Verheijen JH, Firestein GS, Gay S, Neidhart M. Modulation of fibroblast-mediated cartilage degradation by articular chondrocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000c; 43: 2531-2536
- Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol* 2002; 14: 73-81
- Petruzzelli L, Takami M, Humes HD. Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* 1999; 106: 467-476
- Pettit AR, Walsh NC, Manning C, Goldring SR, Gravallesse EM. RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2006; 45: 1068-1076

- 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; 25: 65-78
- Pirilä L und Heino J. Altered integrin expression in rheumatoid synovial lining type B cells: in vitro cytokine regulation of alpha 1 beta 1, alpha 6 beta 1, and alpha v beta 5 integrins. *J Rheumatol* 1996; 23: 1691-1698
- Pirilä L, Aho H, Roivainen A, Konttinen YT, Pelliniemi LJ, Heino J. Identification of alpha6beta1 integrin positive cells in synovial lining layer as type B synoviocytes. *J Rheumatol* 2001; 28: 478-484
- Poole AR, Witter J, Roberts N, Roughly PJ, Webber C, Campbell I. Immunodetection and characterization of the degradation of cartilage proteoglycans in vitro and in vivo. *J Rheumatol* 1987; 14: 80-82
- Poole AR, Rizkalla G, Ionescu M, Reiner A, Brooks E, Rorabeck C, Bourne R, Bogoch E. Osteoarthritis in the human knee: a dynamic process of cartilage matrix degradation, synthesis and reorganization. *Agents Actions Suppl* 1993; 39: 3-13
- Postigo AA, García-Vicuña R, Laffón A, Sánchez-Madrid F. The role of adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 1993; 16:69-76
- Qu Z, Garcia CH, O'Rourke LM, Planck SR, Kohli M, Rosenbaum JT. Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 212-220
- Quan TE, Cowper S, Wu SP, Bockenstedt LK, Bucala R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 598-606
- Reiss Y und Engelhardt B. T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: transendothelial migration of different T cell populations is mediated by endothelial ICAM-1 and ICAM-2. *Int Immunol* 1999; 11:1527-1539
- Rème T, Travaglio A, Gueydon E, Adla L, Jorgensen C, Sany J. Mutations of the p53 tumor suppressor gene in erosive rheumatoid synovial tissue. *Clin Exp Immunol* 1998; 111:353-358
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003; 302: 1704-1709
- 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; 56: 45-51
- Ritchlin C. Fibroblast biology. Effector signal released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res* 2000; 2: 356-360
- Sarkissian M und Lafyatis R. Integrin engagement regulates proliferation and collagenase expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol* 1999; 162: 1772-1779

- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994; 370: 61-65
- Sato H, Takino T, Miyamori H. Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer Sci* 2005; 96: 212-217
- Sawai H, Park YW, Roberson J, Imai T, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell costimulation by fractalkine-expressing synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1392-1401
- Seemayer CA, Kuchen S, Neidhart M, Kuenzler P, Rihosková V, Neumann E, Pruschy M, Aicher WK, Müller-Ladner U, Gay RE, Michel BA, Firestein GS, Gay S. p53 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts at sites of invasion. *Ann Rheum Dis* 2003a; 62: 1139-1144
- Seemayer CA, Kuchen S, Kuenzler P, Rihosková V, Rethage J, Aicher WK, Michel BA, Gay RE, Kyburz D, Neidhart M, Gay S. Cartilage destruction mediated by synovial fibroblasts does not depend on proliferation in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 2003b; 162: 1549-1557
- Shlopov BV, Lie WR, Mainardi CL, Cole AA, Chubinskaya S, Hasty KA. Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 2065-2074
- Silverman MD, Haas CS, Rad AM, Arbab AS, Koch AE. The role of vascular cell adhesion molecule 1/very late activation antigen 4 in endothelial progenitor cell recruitment to rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 2007; 56:1817-1826
- Singer AJ und Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738-746
- Skapenko A, Leipe J, Lipsky PE, Schulze-Koops H. The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: S4-S14
- Smith JB und Haynes MK. Rheumatoid arthritis – a molecular understanding. *Ann Intern Med* 2002; 136: 908-922
- Smith MD, Barg, E, Weedon H, Papangelis V, Smeets T, Tak PP, Kraan M, Coleman M, Ahern MJ. Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 303-307
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314
- Stockwell RA. Chondrocytes. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1978; 12: 7-13
- Szekanecz Z, Kim J, Koch AE. Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Semin Immunol* 2003; 15: 15-21
- Szekanecz Z und Koch AE. Vascular endothelium and immune responses: implications for inflammation and angiogenesis. *Rheum Dis Clin North Am* 2004; 30: 97-114
- Szekanecz Z und Koch AE. Endothelial cells in inflammation and angiogenesis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 319-323
- Szekanecz Z und Koch AE. Mechanisms of disease: angiogenesis in inflammatory diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007; 3: 635-643

Szekanecz Z und Koch AE. Angiogenesis and its targeting in rheumatoid arthritis. *Vascul Pharmacol* 2009; 51: 1-7

Takahara K, Iioka T, Furukawa K, Uchida T, Nakashima M, Tsukazaki T, Shindo H. Autocrine/paracrine role of the angiopoietin-1 and -2/Tie2 system in cell proliferation and chemotaxis of cultured fibroblastic synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Hum Pathol* 2004; 35: 150-158

Turner IH, Slavin AJ, McBride J, Levicnik A, Smith R, Nolan GP, Contag CH, Fathman CG. Treatment of autoimmune disease by adoptive cellular gene therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 998:512-519

Tolboom TC, Pieterman E, van der Laan WH, Toes RE, Huidekoper AL, Nelissen RG, Breedveld FC, Huizinga TW. Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 975-980

Trabandt A, Aicher WK, Gay RE, Sukhatme VP, Nilson-Hamilton M, Hamilton RT, McGhee JR, Fassbender HG, Gay S. Expression of the collagenolytic and Ras-induced cysteine proteinase cathepsin L and proliferation-associated oncogenes in synovial cells of MRL/l mice and patients with rheumatoid arthritis. *Matrix* 1990; 10: 349-361

Tran NL, Adams DG, Vaillancourt RR, Heimark RL. Signal transduction from N-cadherin increases Bcl-2. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by homophilic adhesion and actin cytoskeletal organization. *J Biol Chem* 2002; 277: 32905-32914

Trippel SB. Articular cartilage research. *Curr Opin Rheumatol* 1990; 2: 777-782

Turowski P, Adamson P, Greenwood J. Pharmacological targeting of ICAM-1 signaling in brain endothelial cells: potential for treating neuroinflammation. *Cell Mol Neurobiol* 2005; 25: 153-70

Vallejo AN, Yang H, Klimiuk PA, Weyand CM, Goronzy JJ. Synoviocyte-mediated expansion of inflammatory T cells in rheumatoid synovitis is dependent on CD47-thrombospondin 1 interaction. *J Immunol* 2003; 171: 1732-1740

Veale DJ und Fearon U. Inhibition of angiogenic pathways in rheumatoid arthritis: potential for therapeutic targeting. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006; 20: 941-947

Visse R und Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-839

Wang AZ, Chen JM, Fisher GW, Wang JC, Diamond HS. Improved in vitro models for assay of rheumatoid synoviocyte chemotaxis. *Clin Exp Rheumatol* 1994; 12: 293-299

Westphal JR, Boerbooms AM, Schalwijk CJ, Kwast H, De Weijert M, Jacobs C, Vierwinden G, Ruitter DJ, Van de Putte LB, De Waal RM. Anti-endothelial cell antibodies in sera of patients with autoimmune diseases: comparison between ELISA and FACS analysis. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 444-449

Wheelock MJ und Johnson KR. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 207-235

- Wilkinson LS, Edwards JC, Poston RN, Haskard DO. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in normal and inflamed synovium. *Lab Invest* 1993; 68: 82-88
- Wong M und Carter DR. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* 2003; 33: 1-13
- Woods JM, Klosowska K, Spoden DJ, Stumbo NG, Paige DJ, Scatizzi JC, Volin MV, Rao MS, Perlman H. A cell-cycle independent role for p21 in regulating synovial fibroblast migration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R113
- Woolley MM und Joergenson EJ. Splenectomy in blood dyscrasia. *Calif Med* 1958; 88: 305-308
- Yamamura Y, Gupta R, Morita Y, He X, Pai R, Endres J, Freiberg A, Chung K, Fox DA. Effector function of resting T cells: activation of synovial fibroblasts. *J Immunol* 2001; 166: 2270-2275
- Yasuda T. Cartilage destruction by matrix degradation products. *Mod Rheumatol* 2006; 16: 197-205
- Young A und Koduri G. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007; 21: 907-927
- Youssef PP, Triantafillou S, Parker A, Coleman M, Roberts-Thompson PJ, Ahern MJ, Smith MD. Variability in cytokine and cell adhesion molecule staining in arthroscopic synovial biopsies: quantification using color video image analysis. *J Rheumatol* 1997; 24: 2291-2298
- Zak J, Schneider SW, Eue I, Ludwig T, Oberleithner H. High-resistance MDCK-C7 monolayers used for measuring invasive potency of tumor cells. *Pflugers Arch* 2000; 440: 179-183
- Zvaifler NJ, Boyle D, Firestein GS. Early synovitis – synoviocytes and mononuclear cells. *Semin Arthritis Rheum* 1994; 23: 11-16
- Zvaifler NJ, Tsai V, Alsalameh S, von Kempis J, Firestein GS, Lotz M. Pannocytes: distinctive cells found in rheumatoid arthritis articular cartilage erosions. *Am J Pathol* 1997; 150: 1125-1138

## 8 ANHANG

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

AEC	Aminoethylcarbazol
AMV	<i>avian myeloblastosis virus</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
BSA	bovines Serum Albumin (Rinderserum Albumin)
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMV	Cytomegalovirus
COMP	<i>cartilage oligomeric matrix protein</i>
CRP	C-reaktives Protein
ct	<i>cycle threshold</i>
Deg	Degradationsscore
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	fötales Kälberserum
g	Zentrifugalbeschleunigung; Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>((bi)dest)</sub>	((doppelt) destilliertes) Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I	ipsilateral
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
Ig	Immunglobulin

---

IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
Inv	Invasionsscore
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
Ko	kontralateral
Konz.	Konzentration
LC	LightCycler
lg	Logarithmus
LMM	Laser-medierte Mikrodissektion
m	murin
mind.	mindestens
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MT-MMP	<i>membrane-type MMP</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
n.s.	nicht signifikant
OA	Osteoarthritis, Arthrose
OASF	synoviale Fibroblasten aus Patienten mit Osteoarthrose
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBNS	PBS-BSA-Natriumazid-Saponin-Puffer (für FACS)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PEN	Polyethylenaphtalat
RA	rheumatoide Arthritis
RANKL	<i>receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B ligand</i>
RASF	synoviale Fibroblasten aus Patienten mit rheumatoider Arthritis
Rf	Rheumafaktor
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	reverse Transkription
s.c.	subkutan
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SF	synovialer Fibroblast
<i>sry</i>	<i>sex determining region of Y</i>
T <sub>a</sub>	<i>annealing</i> Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>

---

TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
U	unit (Einheit)
ü. N.	über Nacht
V	Volt
VCAM -1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Verd.	Verdünnung
VLA	<i>very late antigen</i>
ZKF	Zellkulturflasche
ZKM	Zellkulturmedium

## 8.2 Wissenschaftliche Publikationen

### **Originalartikel**

Knedla A, Riepl B, Lefèvre S, Kistella S, Grifka J, Straub RH, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U, Neumann E. The therapeutic use of osmotic minipumps in the SCID mouse model for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68(1): 124-129

Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Schnaeker EM, Turner IH, Robbins PD, Evans CH, Stürz H, Steinmeyer J, Gay S, Schölmerich J, Pap T, Müller-Ladner U, Neumann E. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med* 2009; 15(12): 1414-1420

Neumann E, Riepl B, Knedla A, Lefèvre S, Turner IH, Grifka J, Stürz H, Steinmeyer J, Gay S, Müller-Ladner U. Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 2009, in press

### **Kongressbeiträge**

*Bei Erstautorenschaft wurde der Vortrag selbst gehalten bzw. das Poster selbst vorgestellt.*

B Zimmermann, S Lefèvre, S Fischer, J Gansler, A Lehr, S Rehart, H Stürz, J Steinmeyer, U Müller-Ladner, E Neumann. Aggressiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts is characterized by fast transendothelial migratory, invasive and neoangiogenic potential. *Arthritis Rheum* 2009; 60 (Suppl): S9 Poster

S Lefèvre, B Zimmermann, S Benninghoff, A Lehr, H Stürz, J Steinmeier, S Rehart, U Müller-Ladner, E Neumann. Migration von Subpopulationen primärer synovialer Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis. *Z Rheum* 2009; 68 (Suppl 1) Poster

S Lefèvre, A Knedla, B Zimmermann, IH Turner, H Stürz, J Steinmeyer, S Gay, U Müller-Ladner, E Neumann. Influence of extracellular matrix on the migratory behavior of RASF. *Ann Rheum Dis* 2009; 68(Suppl 3):152 Vortrag

B Zimmermann, S Lefèvre, S Fischer, J Gansler, KW Frommer, H Stürz, J Steinmeyer, U Müller-Ladner, E Neumann. Transmigration and invasion are early events in cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68(Suppl 3): 380 Poster

S Lefèvre, A Knedla, B Zimmermann, H Stürz, J Steinmeyer, T Pap, U Müller-Ladner, E Neumann. Einfluß von Matrixkomponenten sowie der Hemmung von TNF $\alpha$  und VCAM-1 auf das Migrationspotential von RA synovialen Fibroblasten. *Med Klin* 2009, 104(Suppl) Poster

Meier FMP, Frommer K, Brentano F, Lefèvre S, Knedla A, Schröder D, Büchler C, Schäffler A, Steinmeyer J, Stürz H, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E. Visfatin (PBEF) – a dominant mediator of chemotaxis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008, 58(Suppl): S2024 Vortrag

Lefèvre S, Knedla A, Zimmermann B, Steinmeyer J, Stürz H, Pap T, Müller-Ladner U, Neumann E. Effects of VCAM-1 and TNF $\alpha$  inhibition on the migratory potential of rheumatoid synovial fibroblasts in the SCID mouse model of RA. Arthritis Rheum 2008, 58(Suppl): S262 Poster

Lefèvre S, Knedla A, Zimmermann B, Stürz H, Steinmeyer J, Pap T, Müller-Ladner U, Neumann E. Auswirkung von VCAM-1 und TNF $\alpha$ -Hemmung auf das Migrationspotential rheumatoider synovialer Fibroblasten im SCID-Maus Modell der RA. Z Rheum 2008, 67(Suppl 1) Poster

Neumann E, Brückmann S, Funk D, Zimmermann B, Lefèvre S, Steinmeyer J, Fiehn C, Frei E, Müller-Ladner U. Effects of Dexamethasone towards cartilage destruction in the SCID mouse model for RA. Z Rheum 2008, 67(Suppl 1) Poster

Manetti M, Müller A, Saar P, Schmeiser T, Milia AF, Endlicher E, Lefèvre S, Knedla A, Matucci-Cerinic M, Müller-Ladner U, Ibba-Manneschi L, Neumann E. Endothelial/lymphocyte activation and CD4+ T cell infiltration in the gastric mucosa of systemic sclerosis patients. Ann Rheum Dis 2008, 67(Suppl II): 498 Poster

Meier FMP, Frommer K, Brentano F, Lefèvre S, Knedla A, Schröder D, Schäffler A, Büchler C, Steinmeyer J, Stürz H, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E. Inflammatory response of synovial-like fibroblasts to stimulation with visfatin/PBEF. Ann Rheum Dis 2008, 67(Suppl II): 452 Poster

Manetti M, Saar P, Müller H, Milia AF, Lefèvre S, Knedla A, Matucci-Cerinic M, Müller-Ladner U, Ibba-Manneschi L, Neumann E. T and B cell infiltration in the gastric mucosa of systemic sclerosis patients. Ann Rheum Dis 2008, 67(Suppl I): A15 Poster

Meier FMP, Frommer K, Manetti M, Knedla A, Lefèvre S, Schäffler A, Büchler C, Steinmeyer J, Müller-Ladner U, Neumann E. Das Adipokine Visfatin und dessen Einfluss auf die Entzündung in der rheumatoiden Arthritis. Med Klin 2008, 103(3): 10

Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Turner IH, Stürz H, Steinmeyer J, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E. Migrationspotential synovialer Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis: Rolle der extrazellulären Matrix. Med Klin 2008, 103(3): 3 Poster

Meier FMP, Knedla A, Lefèvre S, Frommer K, Schäffler A, Büchler C, Steinmeyer J, Stürz H, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E. The adipokine visfatin and its influence on the inflammatory state in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2007, 56(Suppl): S105 Poster

Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Turner IH, Stürz H, Steinmeyer J, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E. Long distance migration of RASF: Role of extracellular matrix. Arthritis Rheum 2007, 56(Suppl): S436 Poster

Neumann E, Lefèvre S, Knedla A, Stürz H, Distler O, Gay S, Schölmerich J, Müller-Ladner U. Migrationspotential synovialer Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Z Rheum 2007, 66(Suppl I): 25 Poster

Meier FMP, Knedla A, Lefèvre S, Schäffler A, Büchler C, Stürz H, Müller-Ladner U, Neumann E. Das Adipokin Visfatin und dessen Einfluß auf die Entzündung in der rheumatoiden Arthritis.

Z Rheum 2007, 66(Suppl I): 24 Vortrag

Knedla A, Lefèvre S, Schäffler A, Büchler C, Steinmeyer J, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E. Differenzieller Einfluss der Adipokine Resistin und Adiponektin auf die proentzündlichen und matrixabbauenden Signalwege in der rheumatoiden Arthritis.

Z Rheum 2007, 66(Suppl I): 18 Vortrag

Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Stürz H, Pap T, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E. Einfluss der extrazellulären Matrix auf das Migrationspotential der synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis.

Z Rheum 2007, 66(Suppl I): 82 Poster

Manetti M, Tarner IH, Saar P, Milia AF, Polidori L, Knedla A, Lefèvre S, Distler O, Gay S, Matucci-Cerinic M, Müller-Ladner U, Ibba-Menneschi L, Neumann E. Markers of fibrosis in the upper gastrointestinal tract of patients with systemic sclerosis.

Ann Rheum Dis 2007, 66(Suppl II): 217 Poster

Knedla A, Lefèvre S, Schäffler A, Büchler C, Steinmeyer J, Martin M, Seeger W, Günther A, Müller-Ladner U, Neumann E. The potential role of the adipocytokine resistin in comparison to adiponectin as modulator of the inflammatory process in rheumatoid arthritis.

Ann Rheum Dis 2007, 66(Suppl II): 147 Poster

Manetti M, Tarner IH, Saar P, Milia AF, Polidori L, Knedla A, Lefèvre S, Matucci-Cerinic M, Müller-Ladner U, Ibba-Manneschi, Neumann E. Evaluation for markers of fibrosis in the upper gastrointestinal tract of patients with systemic sclerosis.

Ann Rheum Dis 2007, 66(Suppl II): A66 Poster

Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Tarner IH, Stuerz H, Steinmeyer J, Gay S, Mueller-Ladner U, Neumann E. Migration of RA synovial fibroblasts in the SCID mouse model of RA: Identification of the way of migration.

Ann Rheum Dis 2007, 66(Suppl II): A114 Poster

Knedla A, Lefèvre S, Schäffler A, Büchler C, Seeger W, Günther A, Steinmeyer J, Müller-Ladner U, Neumann E. Die Funktion der Adipozytokine Resistin und Adiponektin als Entzündungsmodulatoren in der rheumatoiden Arthritis.

Med Klin 2007, 102(Suppl I): 73 Poster

Lefèvre S, Kampmann A, Knedla A, Tarner IH, Stürz H, Steinmeyer J, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E. Ausbreitung von RA synovialen Fibroblasten im SCID-Maus-Modell: Nachweis der Migration.

Med Klin 2007, 102(Suppl I): 73 Poster und Vortrag

Knedla A, Lefèvre S, Kampmann A, Steinmeyer J, Stürz H, Seeger W, Günther A, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E. The role of the adipocytokines resistin, adiponectin and of surfactant protein A as modulators of the proinflammatory response in RA.

Arthritis Rheum 2006, 54(Suppl 9): S97 Poster

## **Erklärung**

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und 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 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.“

Gießen, den 25.01.2010

Stephanie Lefèvre

## DANKE...

Diese Arbeit entstand am Institut für Rheumatologie und klinische Immunologie des Lehrstuhls für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie der JLU Gießen. Ich möchte allen sehr herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Ulf Müller-Ladner danke ich für die Themenvergabe und damit für die Möglichkeit zur Promotion in einem sehr interessanten Gebiet, die Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Medizin sowie deren Begutachtung. Weiterhin möchte ich ihm für die Möglichkeit der Erstautorenschaft bei der Publikation und für die Teilnahme an zahlreichen Kongressen danken sowie für seine freundliche und motivierende Unterstützung.

Prof. Dr. Michael Martin möchte ich danken, dass er dazu bereit war, diese Arbeit im Fachbereich Biologie zu betreuen.

Besonders danke ich Dr. Elena Neumann für die großartige Unterstützung und Ratschläge sowohl beim Verfassen der Publikation, der Versuchsplanung als auch beim Schreiben sowie für die vielen Anregungen und generelle Hilfe während der ganzen Zeit.

Mein spezieller Dank geht an Simone Benninghoff, die mir während der gesamten Zeit, nicht nur was das Fachliche angeht, eine sehr große Hilfe war. Dies gilt für die Laborarbeit, das Lesen diverser Texte und ihre Kritik. Vielen Dank für deine freundliche Art und das Lösen vieler Probleme.

Ein großer Dank geht an Dr. Ingo H. Tarner, meinen Ex-„Mitbewohner“, für die schöne unvergessliche Zeit in unserer „WG“. Vor allem danke ich ihm dafür, dass er sich über all die Jahre meine Probleme geduldig angehört hat und sogar meistens auch noch irgendwie helfen konnte. Und wem nur mit Schokolade war... Ich habe viel über alte Ami-Autos gelernt...

Sabrina Bückmann danke für ihre Unterstützung bei allem, was mit Mäusen zu tun hatte und vor allem für ihre (meistens) gute Laune, ihre Kreativität und die vielen kleinen Geschenke, mit denen sie immer wieder überraschen konnte.

Vielen Dank an Dr. Anette Knedla und Dr. Andreas Kampmann, die mir während meiner gesamten Zeit bzw. am Anfang meiner Arbeit eine große Hilfe waren.

Ich danke Birgit Zimmermann für die Hilfe bei Maus-OPs; Carina Schreyäck für einige extrem aufwendige Immunhistos; Christoph Tennie für die zeitaufwendige Bearbeitung der Mausorgane; PD Dr. Robert Dinser für die i. a. Injektion in doch eher kleine Mausgelenke sowie die Unterstützung bei der Veröffentlichung; Dr. Matthias Geyer für den gemahlten Knorpel sowie Dr. Klaus Frommer und Rosel Engel.

Ein ganz besonderer Dank geht an Ramona König und Nicole Schröder für sehr viel Spaß auch außerhalb des Labors bzw. der Klinik. Wir haben uns doch noch kennengelernt...

Ich danke unserem „Untermieter“ Florian Meier für die schöne Zeit in unserer „WG“, in Hamburg, Boston und San Francisco.

Ein spezieller Dank geht an Christian Möbs für sehr unterhaltsame e-mails, dass wir uns trotz getrennter Arbeitsplätze auch nach dem Studium nicht aus den Augen verloren haben und uns jetzt hoffentlich wieder öfter sehen. Außerdem danke ich ihm, dass er sich durch meine Arbeit gekämpft hat, obwohl er selbst keine Zeit hatte.

Vielen Dank auch an alle, die für eine aktive Freizeitgestaltung, Ablenkung und viel Spaß gesorgt haben.

Finally... Ich danke ganz besonders meinem Bruder, der sich während der letzten Jahre einiges von mir anhören mußte und versucht hat, mir (mehr oder weniger) geduldig zuzuhören, um dann doch entnervt aufzugeben. Schön, dass du doch noch mit mir redest... Weiterhin danke ich natürlich auch dem Rest meiner Familie, die mich während der ganzen Zeit unterstützt hat.