

**Charakterisierung der Tetraspaninexpression im Synovium  
von Patienten mit rheumatoider Arthritis**

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

vorgelegt von

**Juliane Walther**

Gießen 2023

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Rheumatologie und Klinische Immunologie  
Campus Kerckhoff, Bad Nauheim

Gutachterin: PD Dr. Elena Neumann

Gutachter: Prof. Dr. Markus Rickert

Tag der Disputation: 25. März 2024

Für meine Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

|   |    |
|---|----|
| 1. EINLEITUNG .....   | 1  |
| 1.1 Das Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis .....                       | 1  |
| 1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie .....                           | 1  |
| 1.1.2 Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis .....                       | 1  |
| 1.1.2.1 Aufbau eines gesunden humanen Gelenks .....                           | 1  |
| 1.1.2.2 Pathophysiologische Prozesse bei der rheumatoiden Arthritis.....      | 3  |
| 1.1.2.3 Die Rolle synovialer Fibroblasten in der rheumatoiden Arthritis ..... | 5  |
| 1.1.3 Klinisches Bild.....  | 6  |
| 1.1.4 Diagnosestellung und Differentialdiagnosen .....                        | 8  |
| 1.1.5 Therapie .....  | 9  |
| 1.1.6 Verlauf und Prognose .....  | 11 |
| 1.1.7 Komplikationen .....  | 11 |
| 1.2 Das Krankheitsbild der Arthrose .....                                     | 11 |
| 1.2.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie .....                           | 11 |
| 1.2.2 Pathogenese, klinisches Bild und Diagnostik .....                       | 12 |
| 1.2.3 Therapiemaßnahmen.....  | 12 |
| 1.3 Zelladhäsion und Migration.....   | 12 |
| 1.3.1 Adhäsionsmoleküle .....   | 13 |
| 1.3.2 Rolle der Adhäsionsmoleküle bei der Zellbewegung und Adhäsion .....     | 14 |
| 1.4 Tetraspanine und ihre Rolle bei der rheumatoiden Arthritis .....          | 16 |
| 1.4.1 Die Familie der Tetraspanine .....                                      | 16 |
| 1.4.2 Struktur der Tetraspanine .....   | 17 |
| 1.4.3 Tetraspanin-angereicherte Mikrodomänen.....                             | 18 |
| 1.4.4 Tspan29 / CD9.....  | 20 |
| 1.4.5 Tspan30 / CD63.....   | 21 |
| 1.4.6 Tspan28 / CD81.....   | 22 |
| 1.4.7 Tspan24 / CD151.....  | 23 |
| 1.5 Fragestellung und Ziele .....   | 25 |
| 2. MATERIAL.....  | 26 |
| 2.1 Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Materialien.....                   | 26 |
| 2.2 Herkunft der Gewebeproben .....   | 27 |
| 2.3 Antikörper.....   | 28 |
| 2.5 Primer .....  | 29 |
| 2.6 Für die Zellkultur verwendete Materialien .....                           | 29 |

|  |    |
|--|----|
| 2.7 Geräte .....   | 30 |
| 3. Methoden.....   | 31 |
| 3.1 Histologische Methoden .....   | 31 |
| 3.1.1 Verwendete Gewebeproben .....  | 31 |
| 3.1.2 Anfertigen von Gefrierschnitten.....                                 | 31 |
| 3.1.3 Anfertigung von Paraffinschnitten .....                              | 31 |
| 3.1.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....                                       | 32 |
| 3.2 Immunhistochemie .....   | 32 |
| 3.3 Immunfluoreszenz .....   | 35 |
| 3.4 Doppel-Immunfluoreszenz.....   | 38 |
| 3.5 Mikroskopische Dokumentation.....                                      | 39 |
| 3.6 Zellkultur.....  | 41 |
| 3.6.1 Isolierung und Einfrieren humaner synovialer Fibroblasten .....      | 41 |
| 3.6.2 Auftauen der synovialen Fibroblasten .....                           | 41 |
| 3.6.3 Kultur und Passagieren der synovialen Fibroblasten.....              | 42 |
| 3.6.4 Stimulierung der synovialen Fibroblasten.....                        | 42 |
| 3.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....                        | 43 |
| 3.8 Reverse Transkriptase PCR.....   | 44 |
| 3.8.1 RNA-Isolation.....   | 44 |
| 3.8.2 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription.....                    | 45 |
| 3.9 Real-Time semiquantitative PCR.....                                    | 45 |
| 3.9.1 Optimierung der Primer.....  | 46 |
| 3.9.2 Probenvorbereitung .....   | 46 |
| 3.9.3 Durchführung.....  | 46 |
| 3.10 Auswertungen .....  | 47 |
| 3.10.1 Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbungen.....                      | 47 |
| 3.10.1.1 Auswahl der Synovialgewebe .....                                  | 47 |
| 3.10.1.2 Auswertung des Synovialgewebes .....                              | 47 |
| 3.10.1.3 Score-Definition zur Auswertung der Immunfluoreszenz.....         | 49 |
| 3.10.1.4 Score-Definition zur Auswertung der Doppel-Immunfluoreszenz ..... | 53 |
| 3.10.1.5 Score-Definition zur Beurteilung der Farbintensität von .....     |    |
| Zellen im sublining.....   | 54 |
| 3.10.1.6 Klinische Daten der Gewebe .....                                  | 55 |
| 3.10.2 Auswertung der Stimulationsversuche .....                           | 56 |
| 3.10.2.1 Auswertung der proentzündlichen Reaktion der RASF .....           | 56 |
| 3.10.2.2 Auswertung Tetraspaninexpressionsprofil .....                     | 56 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.11 Statistik.....   | 57  |
| 3.11.1 Statistik der Immunfluoreszenz-Färbungen.....                        | 57  |
| 3.11.1.1 Graphische Darstellung und statistische Auswertung .....           | 57  |
| 3.11.1.2 Korrelationsanalysen .....   | 58  |
| 3.11.2 Statistik der Stimulationsversuche .....                             | 59  |
| 4. ERGEBNISSE .....   | 60  |
| 4.1 Etablierung der immunhistologischen Färbungen.....                      | 60  |
| 4.1.1 Etablierung zum Tetraspanin CD63 .....                                | 60  |
| 4.1.1.1 Etablierung der Immunhistochemie .....                              | 60  |
| 4.1.1.2 Verifikation des Immunhistochemie-Protokolls auf Gewebeproben ..... |     |
| zum Nachweis von CD63 im RA- und OA-Synovium .....                          | 61  |
| 4.1.1.3 Etablierung Immunfluoreszenz .....                                  | 62  |
| 4.1.1.4 Auswertung der Immunfluoreszenzsignale von CD63.....                | 63  |
| 4.1.2 Etablierung zum Tetraspanin CD81 .....                                | 70  |
| 4.1.2.1 Etablierung der Immunhistochemie .....                              | 70  |
| 4.1.2.2 Etablierung der Immunfluoreszenz .....                              | 71  |
| 4.1.2.3 Auswertung der Immunfluoreszenzsignale von CD81.....                | 72  |
| 4.1.3 Etablierung zum Tetraspanin CD151 .....                               | 78  |
| 4.1.3.1 Etablierung der Immunhistochemie .....                              | 78  |
| 4.1.3.2 Etablierung der Immunfluoreszenz .....                              | 80  |
| 4.1.3.3 Auswertung der Immunfluoreszenzsignale von CD151.....               | 80  |
| 4.1.4 Etablierung zum Tetraspanin CD9 .....                                 | 87  |
| 4.1.5 Doppel-Immunfluoreszenz von CD81 und CD151.....                       | 90  |
| 4.1.5.1 Etablierung der Doppel-Immunfluoreszenz.....                        | 90  |
| 4.1.5.2 Auswertung der Doppel-Immunfluoreszenzsignale von CD81 .....        |     |
| und CD151 .....   | 90  |
| 4.1.6 Auswertung der Farbtintensität .....                                  | 97  |
| 4.1.7 Auswertung der Korrelationsanalysen.....                              | 103 |
| 4.2 Fibroblastenstimulierung mit proentzündlichen Stimuli .....             | 108 |
| 4.2.1 Verifikation der proentzündlichen Reaktion der RASF.....              | 108 |
| 4.2.2 Analyse des Tetraspaninexpressionsprofils .....                       | 109 |
| 4.2.2.1 Auswertung der CD63-Expression.....                                 | 110 |
| 4.2.2.2 Auswertung der CD81-Expression.....                                 | 112 |
| 4.2.2.3 Auswertung der CD151-Expression.....                                | 114 |
| 5. DISKUSSION.....  | 117 |
| 5.1 Synovialgewebe von Patienten mit RA und OA .....                        | 118 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.2 Etablierung der Tetraspanin-Immunhistochemie.....                              | 120 |
| 5.3 Tetraspanin-Immunfluoreszenz .....   | 121 |
| 5.3.1 Verteilungsmuster des Tetraspanins CD63 im RA- und OA-Synovium.....          | 122 |
| 5.3.2 Verteilungsmuster des Tetraspanins CD81 im RA- und OA-Synovium.....          | 126 |
| 5.3.3 Verteilungsmuster des Tetraspanins CD151 im RA- und OA-Synovium....          | 127 |
| 5.4 Verteilungsmuster von CD81 und CD151 in der Doppel-Immunfluoreszenz ....       | 130 |
| 5.5 Vergleich der zellulären Signalintensität der Tetraspanin-Färbemuster im ..... |     |
| RA- und OA-Synovium .....  | 132 |
| 5.6 Korrelationen der Expression von Tetraspaninen .....                           | 134 |
| 5.7 Tetraspanin-Expression in stimulierten Fibroblasten .....                      | 138 |
| 5.7.1 Expression des Tetraspanins CD63.....  | 139 |
| 5.7.2 Expression des Tetraspanins CD81 .....                                       | 140 |
| 5.7.3 Expression des Tetraspanins CD151 .....                                      | 141 |
| 5.8 Erkenntnisse zu den Tetraspaninen CD63, CD81 und CD151.....                    | 143 |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG .....   | 145 |
| 7. SUMMARY .....   | 147 |
| 8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....   | 149 |
| 9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....   | 151 |
| 10. TABELLARISCHER ANHANG .....  | 153 |
| 11. LITERATURVERZEICHNIS .....   | 155 |
| 12. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....   | 163 |
| 13. DANKSAGUNG .....   | 164 |

## **1. EINLEITUNG**

### **1.1 Das Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis**

#### **1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie**

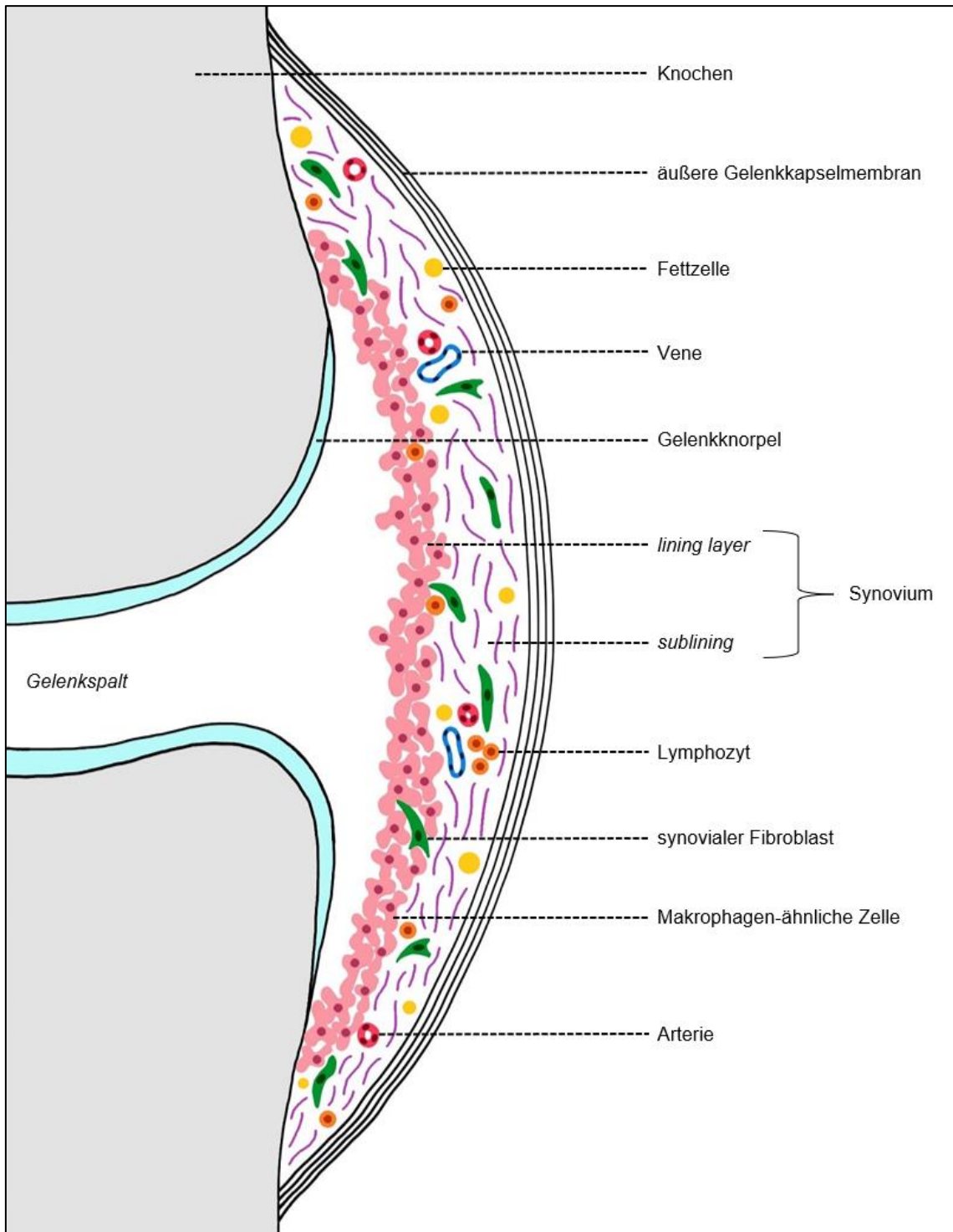
Die rheumatoide Arthritis (RA), auch chronische Polyarthritits oder entzündliches Gelenkrheuma genannt, gehört zu den chronisch-entzündlichen Systemerkrankungen [1, 2]. Durch einen autoimmunologischen Prozess kommt es über eine chronische Entzündung der Gelenkschleimhaut (Synovialitis) zu Entzündungen von Gelenken, Schleimbeuteln und Sehnen [1]. Von der Polyarthritits und gegebenenfalls auch Tendovaginitis sowie Bursitis betroffen sind dabei meistens kleine Gelenke der Hände und Füße [1]. Häufig sind auch extraartikuläre Manifestationen in Organen wie beispielsweise Herz, Lunge und Leber zu finden [1]. Die RA verläuft oft progredient und in Schüben. Ohne eine Behandlung führt die Erkrankung zur Zerstörung der Gelenke und Invalidität [1].

Zum Ende des Jahres 2014 lag die Prävalenz der RA in Deutschland bezogen auf die erwachsene Bevölkerung bei ungefähr 0,8% und belief sich damit auf circa 550.000 Betroffene [3]. Jährlich finden sich 20 - 40 Neuerkrankungen pro 100.000 Personen, wobei der Krankheitsbeginn häufig zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr liegt [3]. Eine erhöhte Prävalenz lässt sich bei „höherem Alter, weiblichem Geschlecht (Frauen dreimal häufiger als Männer), bestimmten genetischen Markern, Rauchen [und] Übergewicht“ [3] feststellen. Die Ätiologie der RA konnte noch nicht abschließend geklärt werden [1, 4].

#### **1.1.2 Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis**

##### **1.1.2.1 Aufbau eines gesunden humanen Gelenks**

Echte Gelenke, auch Diarthrosen genannt, werden durch mindestens zwei Knochen gebildet, die durch einen Gelenkspalt getrennt und damit diskontinuierlich miteinander verbunden sind. Die Gelenkflächen sind von hyalinem Knorpel bedeckt. Das Gelenk wird von einer Gelenkkapsel umfasst, welche aus einer äußeren, aus straffem Bindegewebe bestehenden Membran und einer inneren, sogenannten Synovialmembran (Synovium) gebildet wird (s. Abb. 1). Dabei ist die äußere Membran mit dem Periost der gelenkbildenden Knochen verbunden und dient der Stabilität. Die Synovialmembran ist unter anderem für die Bildung der den Gelenkspalt ausfüllenden Synovialflüssigkeit verantwortlich [5].



**Abb. 1: Schematische Darstellung eines humanen Gelenks mit gesundem Synovium**  
 Dargestellt ist eine menschliche Diarthrose mit schematischer Darstellung eines gesunden Synoviums, welches die innere Membran der Gelenkkapsel darstellt. Außen anliegend folgt die aus straffem Bindegewebe bestehende äußere Membran der Gelenkkapsel. Gebildet wird das Synovium durch die Schichten des *lining layers* und *sublinings*. Dabei ist das *lining layer* charakterisiert durch eine ein- bis vierlagige Schicht aus synovialen Makrophagen und Fibroblasten. Im darunterliegenden *sublining* befinden sich lockeres Bindegewebe, elastische Fasern, Blut- und Lymphgefäße, Nervenfasern, Fibroblasten, Fettzellen, Makrophagen und Lymphozyten.

Die Synovialmembran lässt sich weiterhin in eine innere, dem Gelenkspalt anliegende synoviale Deckschicht (*lining layer*) und eine äußere subsynoviale Schicht (*sublining*) untergliedern. Das *lining layer* entspricht dabei nicht einem Epithel, sondern wird von synovialen Deckzellen (Synoviozyten) gebildet, welche eine ein- bis vierlagige Schicht ausbilden [5]. Es lassen sich zwei unterschiedliche Zelltypen charakterisieren. Die synovialen Makrophagen, ursprünglich A-Zellen genannt, sind makrophagenähnliche Zellen. Sie können somit phagozytieren und überwiegen beim Gelenk von Erwachsenen. Die ursprünglich als synoviale B-Zellen benannten fibroblastenähnlichen Zellen werden inzwischen als synoviale Fibroblasten bezeichnet [5]. Sie bilden einerseits Bestandteile für die Synovialflüssigkeit, welche sowohl für ein Gleiten der Gelenkflächen als auch für die Versorgung des Gelenkknorpels mit Nährstoffen unerlässlich ist, andererseits tragen sie zum Auf- und Abbau der typischen Bindegewebsmatrix bei [5]. Dabei produzieren synoviale Fibroblasten sowohl die Matrixbestandteile wie Kollagene, Fibronectin und Hyaluronsäure, aber auch Enzyme für den Abbau der Matrix wie beispielsweise Matrix-Metalloproteinasen und Kathepsine und deren Inhibitoren. Sie sorgen damit für einen ständigen, aber kontrollierten Umbau des Bindegewebes [6, 7]. Matrix-abbauende Prozesse werden gehemmt, wenn ein eher anti-inflammatorisches Milieu überwiegt [8]. Das dem *lining layer* angrenzende *sublining* ist charakterisiert durch ein lockeres Bindegewebe mit Kollagenfibrillen, elastischen Fasern, Blut- und Lymphgefäßen sowie vegetativen Nervenfasern. Weiterhin enthalten sind Fibroblasten, Fettzellen (Adipozyten) und Makrophagen. Vereinzelt sind weitere Zellen wie beispielsweise Lymphozyten zu finden [5].

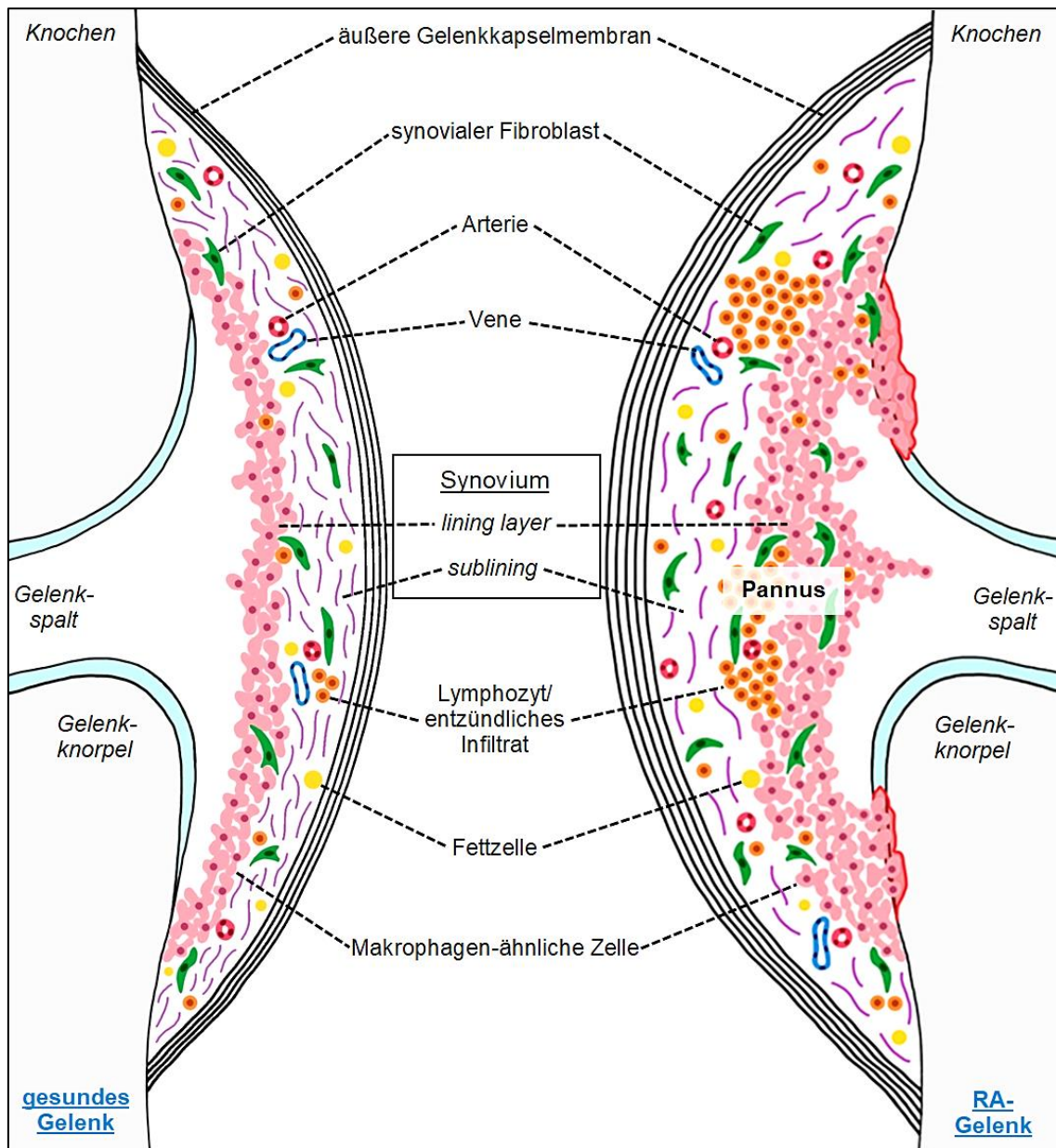
### **1.1.2.2 Pathophysiologische Prozesse bei der rheumatoiden Arthritis**

Die Pathophysiologie der RA ist noch nicht abschließend geklärt. Verschiedene mikrobiologische und immunologische Aspekte scheinen von bedeutender Rolle zu sein. Auf genetischer Ebene ist bei bis zu 70% der Patienten mit RA das HLA-Antigen DR4/DRB1 nachzuweisen [1]. Dem durch dieses Gen kodierten Molekül ließ sich dabei eine Beteiligung bei der Aktivierung von T-Lymphozyten zuordnen [4]. Es wird vermutet, dass bei einer solchen genetischen Disposition bislang unbekanntes bzw. unspezifische Triggermechanismen zur Aktivierung der T-Lymphozyten und zur Induktion der Autoimmunerkrankung führen [1, 4]. Im Bereich der hämatologischen Veränderungen kommt es außerdem zur Aktivierung von B-Lymphozyten, welche daraufhin Immunglobuline, auch Antikörper (AK) genannt, produzieren [4]. Dabei werden einerseits die sogenannten Rheumafaktoren gebildet. Hierbei handelt es sich um Autoantikörper, welche gegen das Fc-Fragment vom IgG gerichtet sind [1]. Weiterhin

lassen sich Immunglobuline gegen zitruillierte Proteine nachweisen, Autoantikörper, die gegen zyklisch zitruillierte Peptide (CCP) gerichtet sind [1]. Die Anti-CCP-Antikörper sind häufig bereits Jahre vor der Manifestation der RA vorzufinden [1]. Obwohl weitere Autoantikörper bei der RA vorkommen können, werden die oben genannten Antikörper als Klassifikations- und Diagnosekriterium bei der RA verwendet.

Bei Betrachtung der zellulären Prozesse werden lokal synoviale Makrophagen angeregt, pro-inflammatorische Zytokine wie beispielsweise Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-15, Chemokine und Wachstumsfaktoren bilden [1, 4, 9]. Die gebildeten Zytokine sind maßgeblich an der für die RA typischen Destruktion von Gelenken beteiligt [4]. So führen sie zu einer Aktivierung von Fibroblasten, welche zur Proliferation angeregt werden und ein erhöhtes Migrationspotential zeigen [4, 10]. Es kommt außerdem zu einer starken Einwanderung von Entzündungszellen wie Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen in das *sublining* der Synovia [4, 11]. Dabei ist auch die Expression von Adhäsionsmolekülen wie Integrinen gesteigert, wodurch die Gefäßneubildung und ein Einwandern weiterer Entzündungszellen gefördert wird [12]. Im Verlauf der RA verdickt sich das *lining layer* und kann eine Tiefe von 10 - 20 Zellschichten erreichen (s. Abb. 2).

Das Wachstum beruht dabei auf der Zunahme beider Typen von Synoviozyten [9]. Es entsteht ein aggressives fibröses Granulationsgewebe, oft Pannus genannt [4, 13]. Charakteristisch ist eine erhöhte Gefäßdichte, ein invasives Wachstum und ein hoher Anteil hochaktiver Enzyme wie Proteinasen und Glykanohydrolasen [13]. Es wächst in den Gelenkspalt vor, invadiert Knorpel und Knochen und führt so zur Destruktion der betroffenen Gelenke [4, 13]. Beteiligt dabei sind außerdem Osteoklasten, die sich aus mononukleären Vorläuferzellen bilden und eine Erosion des Knochens bewirken [4].



**Abb. 2: Schematische Darstellung eines RA-Gelenks**

Dargestellt ist der Vergleich eines gesunden Gelenks mit einem RA-erkrankten Gelenk. Charakteristisch für die RA ist eine Hyperplasie des Synoviums, welches oft als Pannus bezeichnet wird. Das *lining layer* kann eine Dicke von 10 – 20 Zellschichten erreichen. Das Eindringen und Zerstören von Gelenkknorpel und -knochen lässt sich im Verlauf der RA beobachten. RA-synoviale Fibroblasten und entzündliche Vorgänge tragen zum Erkrankungsgeschehen bei. Gefäßneubildung und entzündliche Infiltrate als Folge der vermehrten Einwanderung von Entzündungszellen stellen weitere Merkmale des RA-Synoviums dar.

### 1.1.2.3 Die Rolle synovialer Fibroblasten in der rheumatoiden Arthritis

Neben T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Osteoklasten spielen die ursprünglich als fibroblastenähnliche Synoviozyten bezeichneten RA-synovialen Fibroblasten (RASf) eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der RA [9]. An der Pannus-Knorpel-Verbindung stellen sie den häufigsten Zelltyp dar [11]. Dort produzieren sie Zytokine und Chemokine,

welche die Entzündung aufrechterhalten, sowie Proteasen, welche zentral zur Knorpelzerstörung beitragen [9, 11]. Eine Beteiligung an der Initiierung und Perpetuierung von Immunantworten konnte ebenso beobachtet werden [11]. RASF entwickeln im Verlauf der Erkrankung einen aggressiven Phänotyp, dessen Invasivität und Migrationspotential erhöht ist und somit die Zerstörung von extrazellulärer Matrix verstärkt [9, 10]. Dabei weisen die RASF Veränderungen sowohl der Expression von Markern und Protoonkogenen als auch ihrer Epigenetik und ihres intrazellulären Metabolismus auf [11, 14]. Das Wachstum des RASF-Anteils im Synovium beruht auf einem Ungleichgewicht zwischen Proliferation, Überleben und Tod der Zellen. Dabei fördert das entzündliche Milieu im RA-Synovium das Überleben der synovialen Fibroblasten, indem eine Apoptose durch verschiedene Mediatoren und Prozesse reduziert wird. Beispielsweise konnte eine Erhöhung der Expression anti-apoptotischer Proteine aus der Bcl-2 Familie nachgewiesen werden [9]. Die damit veränderte Regulation des Zellzyklus geschädigter Zellen trägt maßgeblich zum Überleben der RASF bei [9].

### **1.1.3 Klinisches Bild**

Das Krankheitsbild der RA ist äußerst variabel. So manifestieren sich die Beschwerden häufig langsam über mehrere Wochen, doch auch eine plötzliche Entwicklung von Symptomen in einem Zeitraum von wenigen Tagen kann beobachtet werden [4]. Symptome bilden dabei häufig Morgensteifigkeit sowie symmetrische Gelenkschmerzen und -schwellungen, welche in Form einer Polyarthritiden auftreten [4]. Betroffen sind vor allem kleinere Gelenke wie die Metacarpophalangealgelenke (MCP), die proximalen Interphalangealgelenke (PIP) und die Metatarsophalangealgelenke (MTP) [1]. In ungefähr 20 % der Fälle beginnt die Erkrankung mit einer Mono- oder Oligoarthritiden der großen Gelenke [4]. Das Ausmaß der Entzündungszeichen in Form von Schmerzen, welche auch in Ruhe auftreten, Schwellung, Überwärmung oder Ergussbildung ist sehr unterschiedlich. Beeinflussend sind dabei sowohl die Aktivität als auch das Stadium der Erkrankung [4]. Durch eine Schwellung kann es zum Verstreichen des Wellenreliefs der Grundgelenke kommen. Zudem führen Bewegungsschmerz und Schwellung zu einem Querdruckschmerz beim Hände- oder Fußgelenkdruck, was als positives Gaenslen-Zeichen beschrieben wird [1].

Häufig wird die Synovitis der Gelenke von einer Morgensteifigkeit mit einer Dauer von mehr als 30 Minuten begleitet [1]. Da zwischen der Dauer der Morgensteifigkeit und der Entzündungsaktivität eine Korrelation festgestellt werden konnte, gilt die Dauer als wichtiger Parameter zur Verlaufskontrolle [4]. Zudem kommen unspezifische

Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, Myalgien, nächtliches Schwitzen und subfebrile Körpertemperaturen vor [1]. Die voranschreitende Gelenkdestruktion wird oftmals auch durch Entzündungen und Destruktion von Sehnen, Sehnhäuten und Schleimbeutel der Gelenke begleitet. Daraus resultieren funktionelle Einschränkungen bedingt durch Subluxation der Gelenke und eine damit einhergehende Muskelatrophie [4]. Bei den meistens betroffenen Hand- und Fingergelenken kommt es durch diesen Prozess zu typischen Deformitäten. Dazu gehört sowohl die Knopflochdeformität, welche durch eine Flexion der PIP- und eine Hyperextension der distalen Interphalangealgelenke (DIP) verursacht wird, als auch die Deviation der MCP-Gelenke nach ulnar sowie die sogenannte Schwanenhalsdeformität. Letztere entsteht durch eine Hyperextension der PIP- und einer Flexion der DIP-Gelenke [4]. Bedingt durch die Fehlstellung lässt sich oft eine Atrophie der Musculi interossei dorsales beobachten [4]. Weiterhin kann es zu durch die Schwellung verursachten Nervenkompressionssyndromen kommen [4]. Die Kompression des N. medianus kann ein Karpaltunnelsyndrom bewirken, welches ein Einschlafen der Hände und Parästhesien der Finger 1-4 beinhalten kann [1]. Auch der N. ulnaris kann im Sulcus ulnaris oder in der Loge von Guyon von einer Kompression betroffen sein. Klinisch lassen sich Parästhesien der Finger 4 und 5 beobachten [1, 4]. Als weitere Folge des Entzündungsprozesses kann es zur Ruptur von Sehnen und einem damit einhergehenden Verlust der aktiven Beweglichkeit kommen [1].

Bei progressivem Verlauf können neben den äquivalenten Gelenken der Füße auch die Ellenbogen-, Schulter-, Hüft-, Knie-, aber auch Kiefergelenke sowie das Atlantoaxialgelenk der Halswirbelsäule betroffen sein [4]. Sehr selten beteiligt sind die Brust- und Lendenwirbelsäule sowie die DIP-Gelenke der Finger 2-5 [1].

Extraartikuläre Manifestationen kommen vor und gehen häufig mit einem aggressiven Verlauf der Erkrankung einher [4]. Die vielen entzündlichen Organmanifestationen können in der Haut, den Augen, in Lunge, Herz, Magen-Darm-Trakt, Leber, Nieren, Nervensystem, Gefäßen, Skelett sowie im Knochenmark auf unterschiedliche Art in Erscheinung treten [1, 4]. Bei 20 % der Patienten treten Rheumaknoten bei aktivem Krankheitsgeschehen auf [1, 4]. Sie entwickeln sich häufig als subkutane, teilweise indolente Knoten an den Streckseiten von Gelenken wie beispielsweise am Ellenbogen, in Sehnen, können aber auch an anderen Körperstellen und an Organen erscheinen [1, 4]. Histologisch finden sich Fibroblasten, welche palisadenförmig angeordnet sind, eine zentrale fibrinoide Nekrose mit umgebenen Epitheloid- und mononukleären Zellen [1, 4]. In ungefähr 50 % der Fälle kommt es zu pulmonalen Veränderungen in Form einer Pleuritis. Eine interstitielle Lungenfibrose kann bei etwa 10 % der Patienten beobachtet

werden [1, 4]. Organmanifestationen am Herzen äußern sich bei ungefähr 30-50 % der Patienten als Perikarditis oder Herzklappenveränderungen. Auch eine Myokarditis kann vorkommen [1, 4]. Im Bereich der Augen entwickelt sich häufig eine Keratokonjunktivitis sicca als Erscheinung eines sekundären Sjögren-Syndroms. Seltener treten eine Skleritis oder Episkleritis auf [1, 4]. Auch kleinere Gefäße können in Form einer Vaskulitis betroffen sein. Als Folgen können Digitalnekrosen, eine Purpura oder eine rheumatische Polyneuropathie in Erscheinung treten [1, 4].

### **1.1.4 Diagnosestellung und Differentialdiagnosen**

Die Diagnose der RA ist ein Ergebnis aus Befunden, welche im Rahmen von Anamnese, klinischem Erscheinungsbild sowie als Veränderungen der Laborwerte und mittels bildgebender Verfahren gestellt werden [4]. Auch der Verlauf der Erkrankung spielt eine entscheidende Rolle [4].

In Laboruntersuchungen lässt sich bei der RA eine unspezifische, systemische Entzündungsreaktion mit Erhöhung der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), des C-reaktiven Proteins (CRP), der  $\alpha$ -/ $\gamma$ -Globuline und des Serumferritins feststellen. Serumeisen ist dagegen vermindert. Zudem kann sich eine normo-/hypochrome Anämie, eine Thrombozytose und eine Leukozytose entwickeln [1, 4]. Serologisch ist bei 40 % der Patienten bereits am Anfang der Erkrankung der Rheumafaktor positiv. Nach Bestehen der Erkrankung von über zwei Jahren ist bei etwa 80 % der Patienten der Rheumafaktor nachweisbar [1, 4]. Dennoch ist der Rheumafaktor kein spezifischer Marker für die RA, da er auch bei Gesunden oder anderen Erkrankungen nachweisbar sein kann [1]. Ein Nachweis von CCP-AK hat mit 80 % eine vergleichbare Sensitivität als Marker. Die Spezifität liegt hingegen bei 95 % [1, 4]. Antinukleäre Antikörper können bei ungefähr 30 % der Patienten nachgewiesen werden und gehen häufig mit einem schwereren Verlauf der Erkrankung einher [1, 4]. Bei einer Analyse des Synoviums findet sich ein trübes, aber steriles Punktat mit verminderter Viskosität, erhöhter Zellzahl und einem Nachweis von Rhagozyten sowie dem Rheumafaktor [1, 4].

Mittels bildgebender Verfahren lassen sich Knorpel- und Gelenkveränderungen nachweisen. Durch eine Röntgenuntersuchung der Gelenke lassen sich vor allem knöcherne Veränderungen darstellen, welche man durch eine frühe Therapie zu vermeiden versucht. Daher ist in früheren Stadien eine Untersuchung mittels Arthrosonographie oder MRT indiziert. Nachweisbar sind eine Synovitis, Gelenkergüsse, Zysten (beispielsweise eine Baker-Zyste), Veränderungen am Gelenkknorpel und dem Sehnen- und Bandapparat. Pannus und Erosionen sind dabei früher erkennbar als im konventionellen Röntgen [1, 4, 15].

Klassifikationskriterien sollen eine möglichst frühe Diagnosestellung ermöglichen, um durch eine Therapie gravierende Folgen zu vermeiden [4]. Das American College of Rheumatology und die European League Against Rheumatism stellten 2010 die ACR-/EULAR-Klassifikationskriterien für die RA auf (s. Tab. 1) [16].

**Tab. 1: ACR/EULAR Klassifikationskriterien der rheumatoiden Arthritis**

Dargestellt sind die Klassifikationskriterien der RA, 2010 herausgegeben von der ACR/EULAR. Getestet werden sollten Patienten, die eine gesicherte Synovitis in mindestens einem typischen Gelenk aufweisen und diese nicht durch eine andere Ursache erklärt werden kann. Die höchsten erreichten Punktwerte aus jeder Kategorie werden addiert. Werden  $\geq 6$  Punkte erreicht, impliziert dies das Vorliegen einer rheumatoiden Arthritis. ACPA (Antikörper gegen zitruillierte Proteine), CRP (C-reaktives Protein), BSG (Blutsenkungsgeschwindigkeit). *Modifiziert nach Karonitsch 2016 [15]*

| Kriterien   | Punkte |
|---|--------|
| <b>Gelenkbeteiligung</b>  |        |
| 1 großes Gelenk   | 0      |
| 2-10 große Gelenke  | 1      |
| 1-3 kleine Gelenke (mit und ohne Beteiligung der großen Gelenke)  | 2      |
| 4-10 kleine Gelenke (mit und ohne Beteiligung der großen Gelenke) | 3      |
| > 10 Gelenke (mit mindestens einem kleinen Gelenk)                | 5      |
| <b>Serologie</b>  |        |
| Negativer Rheumafaktor und negative ACPA                          | 0      |
| Niedrig positiver Rheumafaktor oder niedrig positive ACPA         | 2      |
| Hoch positiver Rheumafaktor oder hoch positive ACPA               | 3      |
| <b>Akute Phase Proteine</b>                                       |        |
| CRP und BSG normal  | 0      |
| CRP oder BSG abnormal   | 1      |
| <b>Dauer der Symptome</b>   |        |
| < 6 Wochen  | 0      |
| > 6 Wochen  | 1      |

Zu den Differentialdiagnosen gehören vor allem Kollagenosen wie der systemische Lupus erythematodes und Rheumafaktor-negative Spondarthropathien wie die Psoriasisarthritis oder die reaktive Arthritis [4]. Auch Vaskulitiden, Stoffwechselerkrankungen (z.B. Hämochromatose), Arthrose und infektiöse Arthritiden kommen differentialdiagnostisch in Betracht [1, 4].

### 1.1.5 Therapie

Eine Behandlung der RA beinhaltet verschiedene Ansatzpunkte und Verfahren. Dabei ist ein möglichst frühzeitiges Beginnen essentiell, um wesentliche Gelenkschäden einzugrenzen. Die Initialtherapie folgt der Strategie „hit hard and early“ und wird später deeskaliert („step down-Therapie“) [1]. Weitere Ziele der Behandlung bestehen in einer Besserung der Beschwerden und einer klinischen Remission. Diese ist erreicht bei nicht mehr als einem geschwollenen, schmerzhaften Gelenk, niedrigem CRP und Aktivitätsgrad [1]. Von großer Bedeutung ist eine medikamentöse Therapie. Eingesetzt

werden nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR), Kortikosteroide, *Disease-modifying Antirheumatic Drugs* (DMARD) als krankheits-modifizierende Basistherapeutika und Biologika [4].

NSAR werden zur Behandlung von Schmerz und Entzündung eingesetzt, haben aber keinen Einfluss auf den Verlauf der RA [4]. Kortikosteroide werden bei hoher Aktivität als Kurzzeitbehandlung oder als Überbrückung vor Wirkungseintritt der Basistherapeutika eingesetzt. Eine Langzeittherapie mittels Kortikosteroide mit niedriger Dosierung kann als Ergänzung bei therapierefraktärer RA genutzt werden. Eine intraartikuläre Lokalthherapie einzelner Gelenke ist ebenfalls möglich [4]. Unter den DMARDs sind verschiedene Medikamentengruppen zusammengefasst, die eingesetzt werden, um die Krankheitsaktivität zu senken und eine Krankheitsprogression zu verhindern [4]. Das Immunsuppressivum Methotrexat stellt als konventionelles, synthetisches DMARD (*conventional synthetic* DMARD, csDMARD) den Goldstandard dar. Als Alternativen in der Gruppe der csDMARDs werden Leflunomid, Sulfasalazin und Hydroxychloroquin eingesetzt [1, 4, 17]. Die Gruppe der Biologika (bDMARD) stellt eine weitere Therapieoption dar, welche bei schweren Verläufen oder bei Versagen anderer Medikamente zum Einsatz kommt [1, 17]. Hierbei handelt es sich um rekombinant hergestellte Antikörper, welche gegen Schlüsselmoleküle oder -zellen bei entzündlichen immunologischen Prozessen gerichtet sind und diese hemmen [1]. So inhibieren z.B. Adalimumab, Certolizumab, Etanercept, Golimumab und Infliximab das zentrale Zytokin TNF $\alpha$ . Sarilumab und Tocilizumab sind gegen IL-6 bzw. den IL-6-Rezeptor sowie Anakinra und Canakinumab gegen IL-1 bzw. dessen Rezeptor gerichtet [1, 4, 17, 18]. Rituximab und Belimumab hemmen B-Lymphozyten, während Abatacept die Aktivierung der T-Lymphozyten blockiert [1, 4, 17, 18]. Unterschieden werden bei den Biologika Original-Präparate (boDMARD) von Biosimilars (bsDMARD), bei denen es sich um Nachahmerprodukte mit gleichem Wirkstoff handelt [17]. Weiterhin stehen Baricitinib, Tofacitinib, Upadacitinib und Filgotinib als zielgerichtete, synthetische Basismedikamente (*targeted synthetic* DMARDs, tsDMARDs) Inhibitoren der Januskinasen (JAK) zur Verfügung [17, 18]. Die Wirkung der JAK-Inhibitoren beruht dabei auf der Blockierung der Signalwege der Januskinasen, durch die viele Zytokine der Pathophysiologie der RA aktiviert werden [18].

Ergänzend zur medikamentösen Therapie kommen verschiedene physikalisch-therapeutische Maßnahmen zum Einsatz [4]. Im Rahmen von Ergotherapie werden Patientenschulungen und Hilfsmittel zur Verfügung gestellt [4]. Chirurgisch stellen beispielsweise die Synovektomie, Arthrodesen und letztendlich der Gelenkersatz Möglichkeiten zur Therapie dar [4].

### **1.1.6 Verlauf und Prognose**

Der Verlauf der RA ist äußerst variabel. Spontane Remissionen sind mit 5 % sehr selten und begrenzen sich häufig auf die ersten beiden Jahre nach Beginn der Erkrankung [4]. Nach einer Dauer von etwa 10 Jahren sind ungefähr 50 % der unbehandelten Patienten erwerbsunfähig. Die Mortalität ist durch die RA unbehandelt ebenfalls um bis zu 50 % erhöht. Häufig handelt es sich bei der Todesursache um einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall [1]. Risikofaktoren für einen schweren erosiven Krankheitsverlauf stellen eine Beteiligung vieler Gelenke, ein hochtitriger Nachweis des Rheumafaktors und der Entzündungsparameter, eine genetische Disposition, Rauchen, das Auftreten von Rheumaknoten und ein niedriger sozioökonomischer Status dar [1, 4].

### **1.1.7 Komplikationen**

Ohne Therapie führt der Krankheitsverlauf der RA zu typischen Fehlstellungen von Gelenken und damit einhergehendem Funktionsverlust. Beispiele sind sowohl die ulnare Deviation, die Schwanenhals- und Knopflochdeformität der Finger, als auch die atlantoaxiale Subluxation [1]. Auch ein Auftreten von malignen Erkrankungen lässt sich gehäuft feststellen. Zudem sind Nebenwirkungen der Therapie häufig und sehr selten eine sekundäre Amyloidose vom AA-Typ oder ein T-gamma-lymphoproliferatives Syndrom zu beobachten [1].

## **1.2 Das Krankheitsbild der Arthrose**

### **1.2.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie**

Bei der Arthrose, in Englisch als *osteoarthritis* (OA) bezeichnet, handelt es sich um eine degenerative, primär nicht-entzündliche Gelenkerkrankung. Sobald eine Entzündung vorliegt, spricht man von einer aktivierten Arthrose [1, 4]. Untersuchungen zur RA erfolgen oft im Vergleich zur primär degenerativen OA. Auch in dieser Arbeit wurde sie als Vergleichsgruppe herangezogen.

Im Rahmen der OA kommt es zu Umbauvorgängen des hyalinen Gelenkknorpels und des subchondralen Knochens. Sekundär ist auch die Synovia häufig beteiligt [4]. Die OA gilt als häufigste Gelenkerkrankung [1, 4]. Ihre Inzidenz steigt mit zunehmenden Lebensalter und betrifft ab dem 60. Lebensjahr etwa 20 % der Bevölkerung [1].

Für die primäre, idiopathische Arthrose gibt es keine erkennbare Ursache. Die Ursachen sind vielmehr vielfältig. Einflussfaktoren können genetische Faktoren und das Alter sein. Unfälle, Fehlstellungen, Fehlbelastungen, Adipositas und andere rheumatische Gelenkerkrankungen können hingegen Ursache einer sekundären Arthrose sein [1, 4].

### **1.2.2 Pathogenese, klinisches Bild und Diagnostik**

Die Knorpelschädigung, welche im Verlauf der OA auftritt, beginnt im Frühstadium mit einer Demaskierung der Kollagenfibrillen. Später kommt es zu einer Auffaserung des Knorpels, welche zu einem zunehmenden Abbau und im Endstadium zu einer sogenannten Knochenglatze führt. Zusätzlich kommt es im Rahmen der OA zur Bildung von Osteophyten am Gelenkrand und zur Entstehung von Geröllzysten durch fokale Nekrosen des Knochens [1].

Klinisch tritt die OA im Frühstadium vor allem mit Schmerzen in Erscheinung. Typisch ist eine Trias aus Anlauf-, Ermüdungs- und Belastungsschmerz. Spätere Stadien sind eher durch eine Trias aus Dauer-, Nacht- und Muskelschmerz gekennzeichnet. Zudem kommt es zu Bewegungseinschränkungen, Krepitationen und Wetterfühligkeit [1]. Im weiteren Verlauf können durch die Deformierung eine Instabilität und Fehlstellung resultieren. Muskelatrophie und Muskelkontrakturen sind weitere Folgen. Kommt es zusätzlich zu einer Entzündung des Gelenks, finden sich zudem Entzündungszeichen mit einer Überwärmung, Druckschmerzhaftigkeit und einem Gelenkerguss mit Schwellung [1].

Diagnostisch wegweisend sind Anamnese, Klinik und bildgebende Verfahren. Dabei gehören zu den radiologischen Zeichen eine asymmetrische Gelenkspaltverschmälerung, eine subchondrale Sklerosierung, Geröllzysten und Osteophyten [1].

### **1.2.3 Therapiemaßnahmen**

Auch bei der Behandlung der OA gibt es unterschiedliche Ansatzpunkte. Dazu zählen einerseits allgemeine und physikalische Maßnahmen wie beispielsweise das Reduzieren von Übergewicht, eine für die Erkrankung angepasste Belastung des Gelenks, Wärmebehandlung, krankengymnastische Bewegungstherapie mit Muskelaufbau und -kräftigung sowie Patientenschulungen. Andererseits findet auch eine medikamentöse Therapie Anwendung. Eingesetzt werden Paracetamol und NSAR bei entzündlich aktivierten Arthrosen oder intraartikuläre Glukokortikoid-Injektionen bei Therapieversagen anderer Maßnahmen. Als operative Therapie stellt der künstliche Gelenkersatz eine Behandlungsoption dar [1].

### **1.3 Zelladhäsion und Migration**

Zelladhäsion und Zellmigration sind zelluläre Prozesse, die eng miteinander verknüpft sind und bei den pathophysiologischen Vorgängen der RA bei einer Vielzahl an Zellen eine bedeutende Rolle spielen. Neben Entzündungszellen, die vermehrt aus den Gefäßen in das entzündete Synovium eintreten, weisen auch lokale Zellen, wie z.B.

synoviale Makrophagen und Fibroblasten, ein erhöhtes migratorisches Potential im entzündeten Gelenk auf.

### 1.3.1 Adhäsionsmoleküle

In der Plasmamembran von Zellen lassen sich verschiedene integrale Membranproteine finden, die sogenannten Adhäsionsmoleküle, welche oft zelltypspezifisch sind und charakteristische Bindungseigenschaften aufweisen. Sie stellen eine Verbindung zwischen intra- und extrazellulären Strukturen dar. Dabei gibt es einerseits Membranproteine, welche zwischen zwei Zellen interagieren. Dazu gehören die Familien der Cadherine, Nektine, Selektine und Integrine. Andererseits gibt es Membranproteine, wie die Integrine, welche ebenso eine Interaktion zwischen einer Zelle und der extrazellulären Matrix vermitteln können [19]. Bei der Pathogenese der RA spielen vor allem Adhäsionsmoleküle der Selektin-, Integrin-, CAM- (*cell adhesion molecules*) und Cadherin-Familie eine Rolle [20].

In der Familie der Selektine unterscheidet man zwischen E-, P- und L-Selektin. Zu finden sind sie an der Oberfläche von Endothelzellen (E-Selektin), Thrombozyten (P-Selektin) sowie Leukozyten (L-Selektin). Sie besitzen eine Transmembranhelix und einen in den perizellulären Raum ragenden Hauptteil, welcher dort Glykolipide und Glykoproteine binden kann [19].

Integrine stellen eine besonders komplexe Familie von mindestens 24 verschiedenen Oberflächenmolekülen dar und sind die größte Rezeptorfamilie für extrazelluläre Matrixproteine. Sie sind heterodimer und besitzen eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Kette. Zur Familie der Integrine gehören unter anderem die  $\beta_1$ - und die  $\beta_2$ -Subfamilie. Mitglieder der  $\beta_1$ -Familie können an extrazelluläre Matrixproteine, wie beispielsweise Kollagen, Fibronectin oder Laminin, binden. Mitglieder der  $\beta_2$ -Familie hingegen sind nur in Leukozyten zu finden, wodurch diese in der Lage sind, CAMs der Endotheloberfläche zu binden. Gleichzeitig sind Integrine aber auch durch Adapterproteine mit dem Zytoskelett der exponierenden Zelle verbunden. Durch Konformationsänderung ihrer Domänen haben Integrine damit die besondere Fähigkeit einer Signalübertragung in beide Richtungen der Membran. Integrine sind bei vielen lebenswichtigen Vorgängen beteiligt. Neben deren zentralen Bedeutung bei der Zelladhäsion wirken sie bei der Organisation des Zytoskeletts und der Aktivierung diverser Signaltransduktionswege mit. Durch Integrin-Bindungen gelingt es Fibroblasten sezernierte Kollagene zu binden und zu bündeln. Dies spielt unter anderem bei der Wundheilung eine Rolle [19].

CAMs zeichnen sich durch lange extrazelluläre Ketten aus, welche aus vielen immunoglobulinähnlichen Domänen bestehen. Unterscheiden lassen sich vaskuläre

(VCAM) und interzelluläre CAMs (ICAM) von auf Nervenzellen vorliegenden NCAMs. Wechselwirkungen mit Integrinen auf aktivierten Leukozyten können dabei von den vaskulären CAMs eingegangen werden [19]. VCAM-1 lässt sich ebenso auf synovialen Fibroblasten finden. Synoviale Makrophagen exprimieren dagegen vermehrt ICAM-1 [9]. Cadherine sind lange Adhäsionsmoleküle, die aus einem kurzen zytosolischen Segment, mehreren extrazellulären Domänen und einer Transmembranhelix bestehen. Sie werden von epithelialen Zellen (E-Cadherine), von der Plazenta und Epidermis (P-Cadherine) sowie von Nerven- und Muskelzellen (N-Cadherine) gebildet [19]. Cadherin-11 spielt dabei eine Schlüsselrolle bei der Aggregation von RA-synovialen Fibroblasten ohne die eine definierte Auskleidung des *lining layers* nicht ausgebildet werden kann [9].

### **1.3.2 Rolle der Adhäsionsmoleküle bei der Zellbewegung und Adhäsion**

Adhäsionsmoleküle sind bei Vorgängen der Zellbewegung und Zelladhäsion von entscheidender Bedeutung. So ist ein über Integrine vermittelter Kontakt zur Basalmembran für eine korrekte Architektur und Polarität von Zellen essentiell. Im Gesunden stellt dieser Kontakt sicher, dass Zellen nur in der für sie vorgesehenen Umgebung (z.B. im Zellverband) ihre Funktion ausführen. Eine Adhärenz kann ebenso Voraussetzung für eine Wirkung von Wachstumsfaktoren sein [19]. So ist auch die Zelladhäsion von RA-synovialen Fibroblasten an verschiedene extrazelluläre Matrixproteine für die Zellteilung wesentlich [21]. Die Expansion des Synovialgewebes, welche für die RA typisch ist und zur Knorpel- und Knochenzerstörung beiträgt, resultiert unter anderem aus der verstärkten Proliferation synovialer Fibroblasten. Zusätzlich erhöhen Nichtadhärenz oder Störung des Zytoskeletts die Kollagenase-Expression (Metalloproteinase-1) von RASF [21]. Auch dieser Vorgang trägt zum Knochen- und Knorpelabbau bei [21].

Weiterhin beeinflusst das Zusammenspiel verschiedener Adhäsionsmoleküle die Passage von Entzündungszellen durch die Gefäßwand in entzündetes Gewebe (Diapedese). Dort wird durch Entzündungsfaktoren wie den Zytokinen TNF $\alpha$  und IL-1 Endothel zum Exponieren von E-Selektin auf der Oberfläche angeregt. Dies löst eine Kaskade aus, in der verschiedene Adhäsionsmoleküle miteinander interagieren. Zellen der Immunabwehr binden durch Integrine fest an CAMs (z.B. ICAM-1 oder ICAM-2) des Endothels, wodurch eine Infiltration in das entzündete Gewebe ermöglicht wird. Dabei besitzen die Abwehrzellen selbst typische Liganden (z.B. Glykoprotein-Ligand 1 bei neutrophilen Granulozyten und Monozyten), welche an das endotheliale Selektin binden können [19]. Von Bedeutung ist dieser Vorgang der Leukozytenrekrutierung in

entzündetes Gewebe auch im Verlauf der RA [20]. Besonders die Wechselwirkungen von peripheren Blut-T-Zellen mit unterschiedlichen Komponenten des Synoviums spielt dabei eine Rolle. Die T-Zellen zeigen bei Infiltration der Synovialmembran eine erhöhte Bindungsfähigkeit ihrer Adhäsionsrezeptoren. Dies führt zu einem verstärkten Wechselwirken sowohl mit Proteinen der extrazellulären Matrix als auch mit zellulären Liganden wie VCAM-1 und ICAMs [20]. Eine Hochregulation von E-Selektin und ICAM-1 auf dem Synovialendothel konnte ebenfalls beobachtet werden. Auch VCAM-1 scheint bei der RA in den Zellen des *lining layers* und dem *sublining* von Bedeutung zu sein [22]. Die Wechselwirkung der Integrine auf T-Zellen können außerdem intrazelluläre Signalwege beeinflussen und aktivieren [20, 23]. Je nach Zelltyp kann dies zu Proliferation, Sekretion von matrixabbauenden Enzymen, Zytokinproduktion, Migration oder Invasion führen. So ließ sich bei malignen Erkrankungen häufig eine dysregulierte Integrinexpression nachweisen [20, 23]. Bei der RA führt das entzündungsfördernde Milieu, welches im Verlauf der Erkrankung gebildet wird, zu einer Hochregulation von Integrinrezeptoren und ihrer Liganden im Synovialgewebe. Dies hat zur Folge, dass die Integrin-vermittelten Signalwege verstärkt werden und es zu einer erhöhten Produktion von matrixabbauenden Enzymen und Zytokinen kommt [23]. Auch eine Beteiligung von Cadherinen konnte hierbei beobachtet werden [24]. Dieser Prozess kann ebenfalls zur Gewebeschädigung bei der RA beitragen [20]. Ebenso konnte ein verstärkender, aber auch hemmender Einfluss des Entzündungsprozesses durch lösliche Adhäsionsmoleküle beobachtet werden, die im peripheren Blut und in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten vorkommen. Sie werden als Ergebnis sowohl der Freisetzung von Zelloberflächenadhäsionsmolekülen aufgrund von entzündlicher Zellstimulation als auch der De-novo-Synthese von verkürzten löslichen Formen von Adhäsionsmolekülen gebildet [25].

Außerdem konnte bei RASF eine Wanderung durch das Gefäßsystem zum entfernten Knorpel beobachtet werden [26]. RASF scheinen dabei wie auch Leukozyten in der Lage zu sein, mit E-Selektin der Endothelzellen zu interagieren und das Gefäßsystem an entfernten Stellen zu verlassen [26]. Die beim Abbau des Knorpels entstehenden extrazellulären Matrix-Abbauprodukte können zu einer weiteren Aktivierung von Zellen und somit von Integrinen beitragen [23].

Einen wichtigen Einfluss haben Adhäsionsmoleküle auch bei malignen Erkrankungen. Hierbei nutzen metastasierende Tumorzellen einen ähnlichen Vorgang wie bei der Leukozytenrekrutierung, um über Integrine an das Endothel zu binden und mittels des Abbaus von Matrix durch die Basalmembran und Gewebe zu wandern [19]. Tumore

können zudem Integrin-vermittelte Mechanismen nutzen, um eine Apoptose zu vermeiden [23].

## **1.4 Tetraspanine und ihre Rolle bei der rheumatoiden Arthritis**

Tetraspanine sind eine Familie integraler Membranproteine, welche über sogenannte Tetraspanin-angereicherte Mikrodomänen für die Organisation der Zellmembran und ihrer Proteine von großer Bedeutung sind. Über die Akkumulation von Adhäsionsmolekülen an bestimmten Bereichen der Zellmembran (engl. *clustering*) beeinflussen sie zelluläre Vorgänge und Interaktionen und könnten auf diesem Weg auch in der Pathogenese der RA eine wichtige Rolle spielen [27, 28]. Die RA ist charakterisiert durch eine anhaltende Synovialentzündung und eine fortschreitende Zerstörung der Gelenke, welche zu einem großen Teil durch aktivierte RASF mit einem erhöhten Migrationspotential vorangetrieben wird [10]. Im Rahmen früherer Studien wurde bereits die Expression des Tetraspanins CD82 in RASF im Vergleich mit Fibroblasten von Patienten mit Arthrose (OASF) untersucht [29]. Eine erhöhte Expression konnte in diesem Vergleich bei RASF nachgewiesen werden [29]. Außerdem konnte in Untersuchungen vom Synovium des Kniegelenks eine vermehrte Expression im Bereich der Gefäße, des *lining layers* und der Invasionszone sowie eine verminderte Expression im *sublining* festgestellt werden [29]. Diese Beobachtung, zusammen mit funktionellen Untersuchungen an RASF in Kultur, ließ die Schlussfolgerung zu, dass RASF durch eine vermehrte Expression von CD82 im Bereich der Entzündung und Matrixdestruktion vor Ort gehalten werden [11]. Dies wurde dadurch unterstrichen, dass die Motilität der RASF in dieser Arbeit durch Überexpression von CD82 reduziert werden konnte [11]. Da auch andere Tetraspanine eine Rolle in der Pathogenese spielen könnten, wurden in dieser Arbeit die Untersuchung weiterer Tetraspanine, insbesondere CD9, CD63, CD81 und CD151, für die Experimente im Rahmen dieser Dissertation ausgewählt.

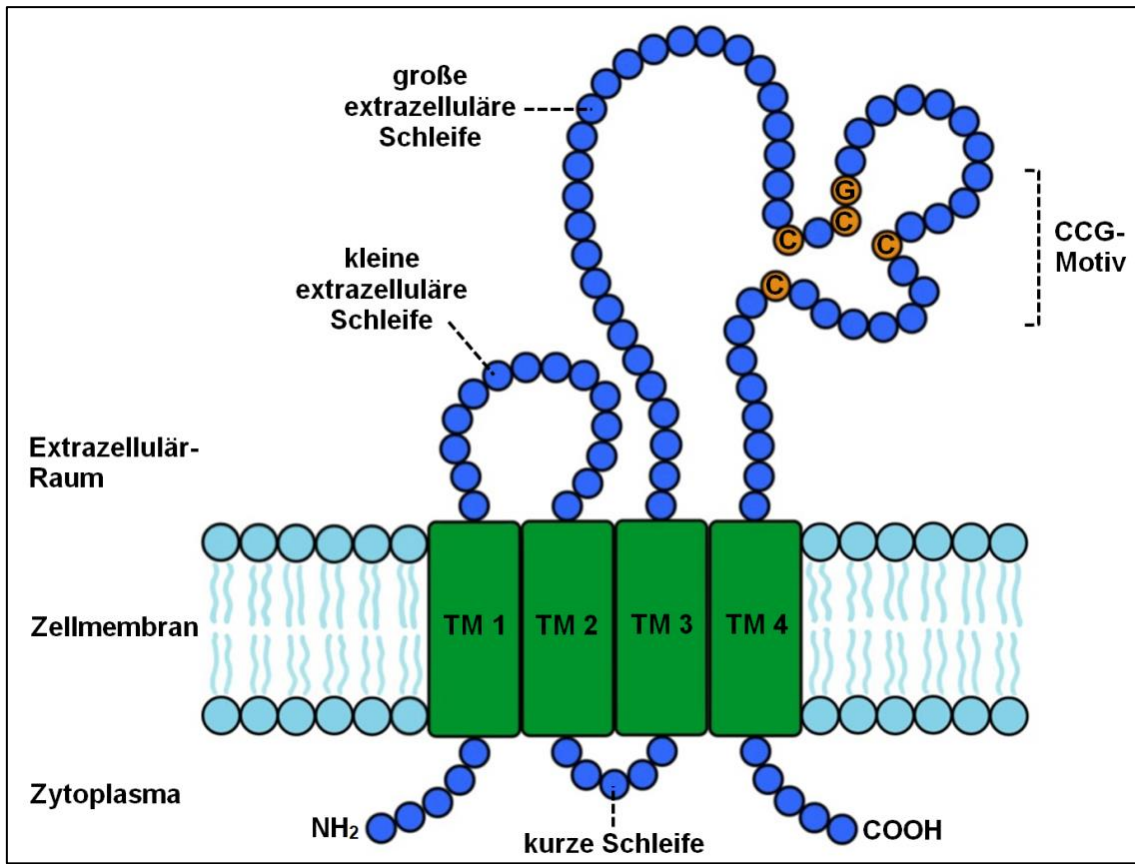
### **1.4.1 Die Familie der Tetraspanine**

Bei den Tetraspaninen, auch Transmembran-4-Superfamilie oder Tspans genannt, handelt es sich um eine Familie integraler Membranproteine mit Molekülgrößen von 20-50 kDa. Wie der Name bereits impliziert, besitzen sie vier  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen [27, 30, 31]. Es konnten bisher 33 verschiedene Tetraspanine beim Menschen identifiziert werden [27, 30]. Einige Tetraspanine, wie beispielsweise CD9, CD81 und CD151, sind weit verbreitet, während andere, wie CD53, CD37 und Tssc6, nur auf speziellen Zellen, in diesem Fall hämatopoetischen Zellen, exprimiert

werden [28]. Die Expression der Tetraspanine CD9, CD63 und CD151 wurde zudem bereits im Synovium von OA-Patienten untersucht [32]. Tetraspanine haben zwar keine bis jetzt nachgewiesenen enzymatischen oder katalytischen Aktivitäten, jedoch sind sie an zahlreichen normalen und pathologischen Prozessen beteiligt, indem sie eine Vielzahl unterschiedlicher Signalereignisse ermöglichen können [31, 33]. So spielen sie eine Rolle bei der Zellmigration, der Signaltransduktion [27], Zellproliferation und Differenzierung, aber auch bei der Metastasierung von Zellen [33]. Einigen Familienmitgliedern der Tetraspanine wird eine pro-metastatische Funktion zugeschrieben, während bei anderen eine hemmende Funktion der Metastasierung beobachtet wurde [34]. Über die Funktion der Tetraspanine bei der RA sind bisher wenig Untersuchungen zu finden.

### **1.4.2 Struktur der Tetraspanine**

Die Struktur der Proteine wird zusätzlich zu den vier Transmembransegmenten (TM1-4) ergänzt durch zwei extrazellulären Domänen (EC 1 und 2) und drei zytoplasmatischen Regionen (N-, C-Terminus und eine kurze Schleife) [27, 30, 33, 35]. Bei den extrazellulären Domänen handelt es sich um eine kleine Schleife (EC 1) zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne sowie einer großen Schleife (EC 2) zwischen der dritten und vierten TM-Domäne (s. Abb. 3). Hierbei ist vor allem die große Schleife maßgeblich an heterophilen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen beteiligt, kann aber auch eine Tetraspanin-Dimerisierung vermitteln [30]. Die TM-Domänen gehen vor allem intramolekulare Wechselwirkungen ein, die die funktionelle Proteinkonformation unterstützen, sind aber auch fähig, homophile und heterophile Wechselwirkungen mit anderen Tetraspaninen einzugehen [30]. Die zytoplasmatischen Regionen können zum Teil mit zytosolischen Signal- oder Gerüstproteinen interagieren [30]. Die C- und N-Termini der Tetraspanine weisen keine Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen Familienmitgliedern auf, wodurch diese Regionen unterschiedliche Funktionen haben können [33]. Auch die anderen Domänen tragen in unterschiedlichem Maße zu Struktur und Wechselwirkungen der verschiedenen Tetraspanine bei [30].



**Abb. 3: Schematische Darstellung eines Tetraspanins**

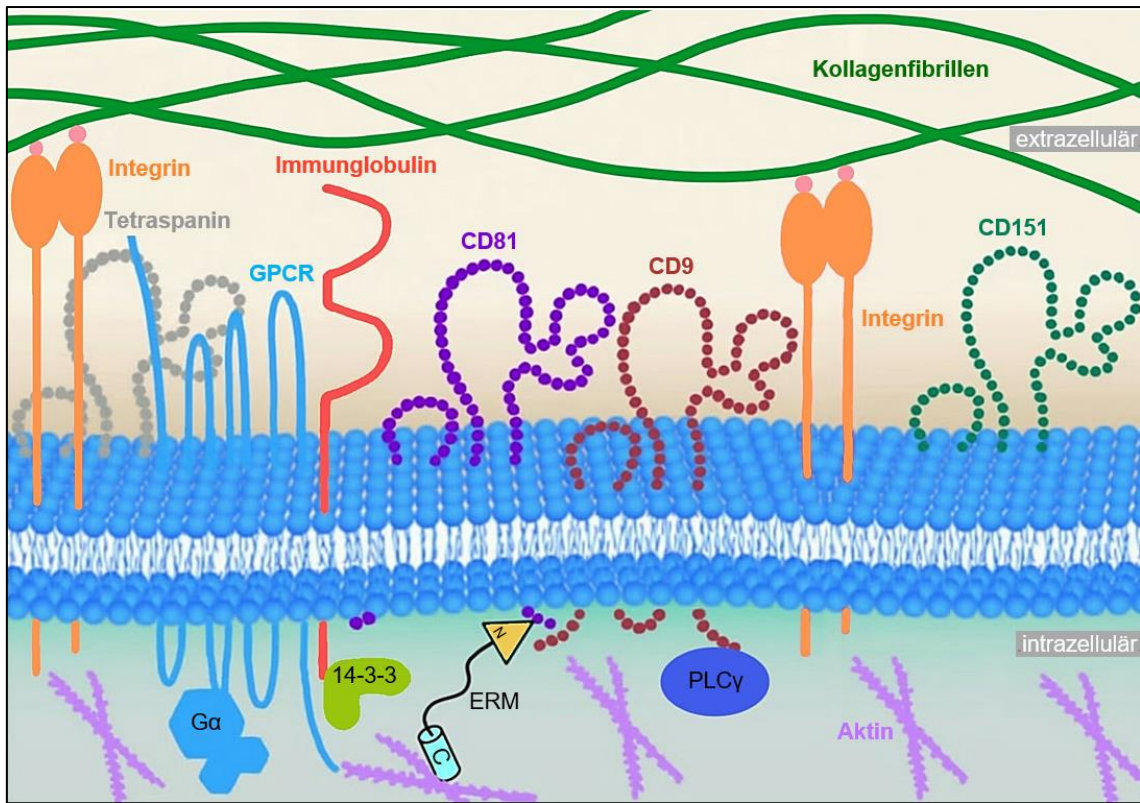
Schematisch dargestellt ist die allgemeine Struktur der Tetraspanine. Diese beinhaltet vier Transmembransegmente (TM1-4), zwei extrazelluläre Domänen (kleine und große Schleife) und drei zytoplasmatische Regionen (N-, C-Terminus und eine kurze Schleife). Die Cys-Cys-Gly-Sequenz (CCG-Motiv) und die Position des letzten Cysteinrests in der großen extrazellulären Schleife sind in allen Tetraspaninen zu beobachten. *Nach Yang, Sari et al. 2016 - Tetraspanins: Figure 1 [36].*

Ein weiteres Kennzeichen der Tetraspanin-Superfamilie ist eine Cys-Cys-Gly-Sequenz (CCG-Motiv) innerhalb der großen extrazellulären Schleife [33]. Außerdem enthält diese Schleife zwei oder vier zusätzliche Cysteinreste, wobei die Position des letzten Cysteinrests 11 Aminosäuren vom Beginn der vierten TM-Domäne entfernt ist [33]. Weiterhin findet sich bei mehr als der Hälfte der Tetraspanine eine Pro-x-x-Cys-Cys-Sequenz (das PxxCC-Motiv). Die beiden Aminosäuren zwischen Prolin und Cystein können beliebig besetzt sein [33]. Eine Kombination dieser Merkmale unterscheidet Tetraspanine von zahlreichen anderen Proteinen, die ebenfalls vier Transmembran-domänen aufweisen [33].

### 1.4.3 Tetraspanin-angereicherte Mikrodomänen

Tetraspanine haben eine bedeutende Rolle bei der Organisation der Plasmamembran, da sie die Eigenschaft besitzen, funktionelle Einheiten zu bilden [27, 28]. Diese Einheiten

werden als Tetraspanin-angereicherte Mikrodomänen (*tetraspanin-enriched microdomains*, TEMs) bezeichnet [27, 28] (s. auch Abb. 4).



**Abb. 4: Darstellung einer Tetraspanin-angereicherten Mikrodomäne**

Schematisch und beispielhaft dargestellt ist eine Tetraspanin-angereicherte Mikrodomäne (TEM), welche verschiedene Tetraspanine und Bindungspartner enthält. Gezeigt sind als mögliche Wechselwirkungs-partner: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR mit gebundenem G-Protein); Mitglieder der Immunglobulin-Familie mit gebundenem, regulatorisch wirkendem 14-3-3-Protein; Mitglieder der Integrin-Familie mit Interaktionen zu Kollagenfibrillen der Extrazellulärmatrix; Phospholipasen (hier Phospholipase C vom  $\gamma$ -Typ (PLC $\gamma$ )). Über ERM-Proteine (Aktin-bindende Proteine mit N- und C-Terminus) erleichtern TEMs die Signalübertragung und ermöglichen die Rekrutierung von Aktin des Zytoskeletts. *Modifiziert nach Levy 2014 - Function of the tetraspanin molecule: Figure 2 [37].*

Diese Mikrodomänen ermöglichen Membrandynamiken wie Endozytose, Recycling, Exozytose, Zellmotilität (Adhäsion und Migration) [28, 33] und Zellfusion [38, 39]. Sie erleichtern die Signalübertragung von extrazellulären Stimuli zu intrazellulären Signalwegen [37–39]. So sind TEMs beispielsweise über eine Aktivierung von Proteinen der ERM-Familie (Aktin-bindende Proteine) an der Rekrutierung von Aktin des Zytoskeletts beteiligt [37]. In unterschiedlichen Studien konnten verschiedene Wechselwirkungen der Tetraspanine nachgewiesen werden. Es finden sich einerseits starke Wechselwirkungen zwischen Tspans und Nicht-Tspan-Bindungspartnern wie zum Beispiel Integrinen (vor allem  $\beta$ -Integrine) [28, 33, 40, 41], Signalrezeptoren (z.B. Kinasen und kleine GTPasen) [38, 42, 43], Wachstumsfaktorrezeptoren [43],

Immunglobulinen, Adhäsionsmolekülen und Proteasen [38]. Andererseits bestehen schwache Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Mitgliedern der Tspan-Familie [27, 44–46]. Größe und Form der Tspan-Mikrodomänen unterscheiden sich. Dabei bedecken die Tetraspanin-Cluster eine Oberfläche von ungefähr 100 - 400 nm<sup>2</sup> [27, 30, 47].

### **1.4.4 Tspan29 / CD9**

CD9 oder Tspan 29 in der systematischen Nomenklatur ist ein 21-24 kDa großes Protein und ist durch eine breite Zell- und Gewebeverteilung charakterisiert [48]. So findet man CD9 auf allen Hauptgruppen von Leukozyten [48], auf normalen hämatopoetischen, endothelialen und epithelialen Zellen, in Membranen von Exosomen [49], auf Eizellen [50, 51] und auf vielen malignen Tumorzellen [52].

Anfangs wurde CD9 als lymphohämatopoetischer Marker identifiziert [48, 53]. Mittlerweile ist CD9 auch eine Beteiligung bei verschiedensten Zellprozessen zugewiesen worden. So spielt es ebenso eine Rolle bei der Motilität, Proliferation, Differenzierung, Fusion und Adhäsion von Zellen [48]. Des Weiteren modifiziert CD9 Signale für Phagozytose und Entzündungsreaktionen auf Makrophagen [52, 54]. Auch eine Mitwirkung bei der Spermien-Ei-Fusion [50, 51], Neuritenwachstum, Myotubenbildung, Wundheilung [55], Virusinfektionen, Tumorigenität und Metastasierung konnte beobachtet werden [48, 50].

In Untersuchungen zur Tumorentstehung konnte CD9 als Suppressor der Tumorausbreitung identifiziert werden [52, 56]. Eine reduzierte CD9-Expression korrelierte dabei mit einer Invasion und Metastasierung sowie einer schlechten Prognose [52]. Die Korrelation zwischen reduzierter CD9-Expression und schlechter Prognose konnte bereits bei Studien zu Melanomen, nicht-kleinzelligen Lungentumoren, Mamma-, Kolon-, Pankreas-, Ovarial- und Prostata-Karzinomen beobachtet werden (vgl. Tab. 2) [52]. Eine Beteiligung von CD9 bei der Metastasierung konnte in verschiedenen Studien zu Gastro-Intestinal-Karzinomen nachgewiesen werden. Auch hier konnte man eine umgekehrte Korrelation aufzeigen [52].

Im Rahmen von Untersuchungen zur Arthrose und zur Antigen-induzierten Arthritis reduzierte ein CD9-Mangel den Schweregrad der Erkrankung mit Verringerung von Knorpelabbau und Weichteilentzündung [57, 58].

Interaktionen von CD9 wurden mit Integrinen, Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie und anderen Tetraspaninen (z.B. CD81 und CD151) Claudin-1, epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und membrangebundenen Liganden des EGFR nachgewiesen [35, 44, 52].

**Tab. 2: Einfluss von CD9 bei der Migration und Metastasierung von Tumorzellen**

Aufgelistet sind die Ergebnisse einiger ausgewählter Studien zum metastasierungsfördernden oder -hemmenden Einfluss des Tetraspanins CD9 bei verschiedenen Tumorerkrankungen. Die Zahl der Markierungen (♦) gibt die Anzahl der Studien mit diesem Ergebnis wieder. *Die Auflistung orientiert sich an Jiang, Zhang et al. 2015 [41]. Kein Anspruch auf Vollständigkeit.*

| Art des Tumors               | CD9-Einfluss als |            |
|------------------------------|------------------|------------|
|                              | Promoter         | Suppressor |
| Kleinzelliges Lungenkarzinom |                  | ♦♦         |
| Pankreaskarzinom             |                  | ♦          |
| Kolonkarzinom                |                  | ♦          |
| Melanom                      | ♦                | ♦          |
| Fibrosarkom                  |                  | ♦          |
| Multiples Myelom             |                  | ♦          |
| Mammakarzinom                | ♦♦               | ♦          |
| Ovarialkarzinom              |                  | ♦          |
| Prostatakarzinom             | ♦                |            |

### 1.4.5 Tspan30 / CD63

CD63 oder Tspan30 in der systematischen Nomenklatur wird ebenfalls ubiquitär exprimiert und lässt sich sowohl auf Zelloberflächen als auch in Membranen von Endo- [34, 59] und Exosomen [60, 61] nachweisen.

Beteiligt ist CD63 an Zelladhäsion, Motilität, Proliferation, Differenzierung und dem Überleben von Zellen [60, 62, 63]. Auch ein Beitrag zur Aktivierung von Kinasen oder mit Metalloproteinasen interagierenden Oberflächenproteinen [62] sowie eine Beteiligung an der Virionproduktion des HIV-Virus [64] konnte dem Tetraspanin zugewiesen werden [34].

Des Weiteren spielt CD63 bei Tumorprozessen eine Rolle. So konnte eine erhöhte Expression in Glioblastomen und Astrozytomen [60], beim Mammakarzinom [65], Pankreaskarzinom [66] und in Melanomen [67] beobachtet werden (vgl. Tab. 3). Eine Überexpression von CD63 erhöht dabei das intrinsische Metastasierungspotential von Tumorzellen. Eine Beteiligung bei pro-metastatischen Signalwegen und eine Beeinflussung der Zellplastizität konnte hierbei festgestellt werden. [34]. Auch als prognostischer Faktor konnte CD63 bei gastrointestinalen Tumoren identifiziert werden [68, 69]. Einige Studien zum Plattenepithelkarzinom der Zunge, Ösophaguskarzinom und Melanomen zeigten CD63 jedoch auch als Inhibitor von Malignität und Metastasierung [63, 70].

Im Rahmen von Untersuchungen der polymorphkernigen Neutrophilen aus der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten wurde interessanterweise die CD63-Expression als Membranmarker einer Aktivierungsstufe der Neutrophilen identifiziert [71].

Eine Komplexbildung mit CD63 ist unter anderem für TIMP-1 und  $\beta$ 1-Integrin sowie für das Tetraspanin CD151 bekannt [72, 73].

**Tab. 3: Einfluss von CD63 bei der Migration und Metastasierung von Tumorzellen**

Aufgelistet sind die Ergebnisse einiger ausgewählter Studien zum metastasierungsfördernden oder -hemmenden Einfluss des Tetraspanins CD63 bei verschiedenen Tumorerkrankungen. Die Zahl der Markierungen (♦) gibt die Anzahl der Studien mit diesem Ergebnis wieder. *Die Auflistung orientiert sich an Jiang, Zhang et al. 2015 [41]. Kein Anspruch auf Vollständigkeit.*

| Art des Tumors    | CD63-Einfluss als |            |
|-------------------|-------------------|------------|
|                   | Promoter          | Suppressor |
| Zungenkarzinom    |                   | ♦          |
| Ösophaguskarzinom |                   | ♦          |
| Pankreaskarzinom  | ♦                 |            |
| Kolonkarzinom     |                   | ♦          |
| Melanom           | ♦                 | ♦♦         |
| Glioblastom       | ♦                 |            |
| Astrozytom        | ♦                 |            |
| Mammakarzinom     | ♦                 |            |

#### 1.4.6 Tspan28 / CD81

CD81 (Tspan28 in der systematischen Nomenklatur) ist ein nicht glykosyliertes Protein und unterscheidet sich daher von anderen bekannten Tetraspaninen, die in einer der beiden extrazellulären Domänen glykosyliert sind [74]. Es wird wie die meisten Tetraspanine in einer Vielzahl von Zellen exprimiert [51]. Dies umfasst beispielsweise Zellen des hämatopoetischen Systems einschließlich B-Zellen, T-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen [75], aber auch andere Zellen wie z.B. Trophoblasten [76].

Beteiligt ist CD81 bei systemischen Effekten wie z.B. dem Eisenstoffwechsel [77]. Es zeigte sich außerdem eine Mitwirkung bei zellulären Mechanismen, wie z.B. der Eizellbefruchtung [43], B-Zell-Aktivierung [78] sowie bei der T-Zell-Differenzierung im Rahmen der Pathogenese von Präeklampsie [76]). Des Weiteren ist CD81 eine Beteiligung an funktionellen (z.B. Adhäsion, Migration, Proliferation [75, 78]) sowie molekularen Mechanismen (z.B. Rezeptorclustering und Signalübertragung wie Aktivierung der extrazellulären signalregulierten Kinase (Erk) [31, 74, 75, 78]) zuzuordnen.

Eine erhöhte Wachstumsrate und Tumorprogression, z.B. bei Haut- und Lebertumoren durch eine Hochregulation von CD81 [43, 74], konnte nachgewiesen werden (vgl. Tab. 4). Im Rahmen von Untersuchungen zu Mammakarzinomen zeigte sich eine erhöhte CD81-Expression und eine Korrelation mit Metastasierungsvorgängen, dem klinischen Stadium und einer schlechteren Prognose [79]. Vergleichsweise ging beim Plasmazellmyelom ein CD81-negativer Befund mit einer besseren Prognose einher [77]. Im Gegensatz dazu war beim hepatozellulären Karzinom der Verlust von CD81 mit einer Differenzierung und Metastasierung verbunden [80].

Weiterhin konnte eine Rolle von CD81 bei Infektionen mit enteropathogenem Escherichia coli (EPEC) [31], Plasmodium falciparum-Sporozoit in Hepatozyten und dem Hepatitis-C-Virus festgestellt werden [74].

Molekular wird eine Komplexbildung unter anderem mit weiteren Tetraspaninen wie CD9, CD19, CD21, CD82, CD151 sowie weiteren Oberflächenmolekülen wie dem B-Zell-Rezeptor, Integrinen und Immunglobulinen beobachtet [43, 75, 78, 79].

**Tab. 4: Einfluss von CD81 bei der Migration und Metastasierung von Tumorzellen**

Aufgelistet sind die Ergebnisse einiger ausgewählter Studien zum metastasierungsfördernden oder -hemmenden Einfluss des Tetraspanins CD81 bei verschiedenen Tumorerkrankungen. Die Zahl der Markierungen (♦) gibt die Anzahl der Studien mit diesem Ergebnis wieder. *Die Auflistung orientiert sich an Jiang, Zhang et al. 2015 [41]. Kein Anspruch auf Vollständigkeit.*

| Art des Tumors            | CD81-Einfluss als |            |
|---------------------------|-------------------|------------|
|                           | Promoter          | Suppressor |
| Hepatozelluläres Karzinom | ♦                 | ♦          |
| Melanom                   | ♦                 |            |
| Plasmazellmyelom          | ♦                 |            |
| Mammakarzinom             | ♦                 |            |

#### 1.4.7 Tspan24 / CD151

CD151 oder Tspan24 in der systematischen Nomenklatur ist das erste charakterisierte Mitglied der Tetraspaninfamilie. Es ist auch bekannt als Glykoprotein-27 (GP-27), Antigen der roten Blutkörperchen MER 2 (MER 2), Thrombozyten-Endothel-Tetraspan-Antigen-3 (PETA-3) oder Raph-Blutgruppen-Antigen (RAPH)/ Membranglykoprotein SFA-1 (SFA-1) [81]. CD151 ist in mehreren Zelltypen verbreitet und konnte unter anderem als Oberflächenprotein in Endothelzellen und Blutplättchen nachgewiesen werden [73], kommt aber auch intrazellulär in zytoplasmatischen Vesikeln und in perinukleären Regionen vor [82].

CD151 ist an Funktionen wie der Aufrechterhaltung einer normalen zellulären Integrität, der Kommunikation zwischen Zellen, an der Wundheilung [83], Blutplättchenaggregation, Regulation der Membranfusion, Zellmotilität und der Angiogenese [84] sowie intrazellulär an der Aktivierung von kleinen GTPasen beteiligt [73, 85]. Außerdem werden CD151 pro-tumorigene und pro-metastatische Funktionen zugeschrieben (vgl. Tab. 5) [81, 84–86]. Bei einer hochregulierten Expression von CD151 finden sich häufig epitheliale Malignitäten und eine schlechte Prognose [85, 86]. Eine Überexpression korreliert zudem mit der Tumorgröße, der Invasionstiefe und einem fortgeschrittenem Stadium des Tumors [73, 87]. Ebenso konnte ein ausgeprägter Gradient der CD151-Expression besonders an der invasiven Front von Tumoren festgestellt werden [73, 88]. Bei einer Studie konnte weiterhin beobachtet werden, dass eine Immunisierung gegen CD151-Peptide ein Fortschreiten der Tumorerkrankung unterdrückte und zu einem längeren Gesamtüberleben im Mausmodell beitrug [86]. Bestätigt wurde diese Funktion in Studien zum Plattenepithelkarzinom der Haut, bei Lungen- [89], Kolon- [90], Ösophagus- [91], Pankreas- [92], hepatozellulären [93],

Gallenblasen- [93], Ovarial- [94] und Endometriumkarzinomen [73, 93, 95]. CD151-Knockout-Mäuse zeigten in einigen Untersuchungen eine Abnahme der Tumorlatenz, der Tumorinzidenz, der Multiplizität und der Größe [73]. Auch ein Zusammenhang zwischen einer hochregulierten CD151-Expression und einer Resistenz gegen eine medikamentöse Tumortherapie ließ sich erkennen [96]. Des Weiteren wurde eine Beteiligung an der Regulation der Expression des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (FGFR2) entdeckt, welche auf eine Mitwirkung bei der Mammakarzinomentstehung hinweist [85, 97].

**Tab. 5: Einfluss von CD151 bei der Migration und Metastasierung von Tumorzellen**

Aufgelistet sind die Ergebnisse einiger ausgewählter Studien zum metastasierungsfördernden oder -hemmenden Einfluss des Tetraspanins CD151 bei verschiedenen Tumorerkrankungen. Die Zahl der Markierungen (♦) gibt die Anzahl der Studien mit diesem Ergebnis wieder. *Die Auflistung orientiert sich an Jiang, Zhang et al. 2015 [41]. Kein Anspruch auf Vollständigkeit.*

| Art des Tumors            | CD151-Einfluss als |            |
|---------------------------|--------------------|------------|
|                           | Promoter           | Suppressor |
| Lungenkarzinom            | ♦                  |            |
| Zungenkarzinom            | ♦                  |            |
| Ösophaguskarzinom         | ♦                  |            |
| Magenkarzinom             | ♦                  |            |
| Hepatozelluläres Karzinom | ♦♦                 |            |
| Gallenblasenkarzinom      | ♦                  |            |
| Pankreaskarzinom          | ♦                  |            |
| Kolonkarzinom             | ♦                  |            |
| Epidermalkarzinom         | ♦♦♦♦               |            |
| Fibrosarkom               | ♦                  |            |
| Glioblastom               | ♦                  |            |
| Mammakarzinom             | ♦♦♦♦               |            |
| Ovarialkarzinom           | ♦                  |            |
| Endometriumkarzinom       | ♦                  |            |
| Zervixkarzinom            | ♦                  |            |
| Prostatakarzinom          | ♦♦                 |            |

Im Rahmen von Studien zur Arthrose konnte eine vermehrte Expression von CD151 im arthrotischen Knorpel und eine mögliche Mitbeteiligung bei der Knorpelzerstörung gezeigt werden [98]. Auch eine Beteiligung bei Asthma, Influenza und idiopathischer Lungenfibrose wurde beschrieben [82].

Komplexe bildet CD151 mit verschiedenen Integrinen (z.B.  $\alpha 3\beta 1$ -,  $\alpha 6\beta 1$ -,  $\alpha 7\beta 1$ - und  $\alpha 6\beta 4$ ), intrazellulären Signalmolekülen wie Phosphoinositid-4-Kinase (PI4K) und Proteinkinase C (PKC), Adhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Metalloproteinasen, Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie und anderen Tetraspaninen wie CD9, CD63 und CD81 [73, 82]. Besonders die spezifische Bindung an Laminin-bindende Integrine ist für die Rolle von CD151 bei der Adhäsion, Migration und Signalübertragung von Bedeutung [73, 97].

## 1.5 Fragestellung und Ziele

Die Rolle verschiedener Tetraspanine bei Tumorerkrankungen wurde vielfach untersucht und eine Beteiligung bei der Metastasierung nachgewiesen. Die rheumatoide Arthritis ist im Vergleich hierzu durch eine anhaltende Synovialentzündung und einer Gelenkzerstörung charakterisiert, welche zu einem großen Teil durch aktivierte Synovialfibroblasten mit einem erhöhten Migrationspotential vorangetrieben wird und zahlreiche Parallelen zu malignen Erkrankungen aufweist [10]. Dies impliziert, dass Tetraspanine auch einen Einfluss auf die Migration von RA-Synovialfibroblasten haben könnten. Im Rahmen früherer Studien wurde die Expression des Tetraspanins CD82 in Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis im Vergleich mit Fibroblasten von Patienten mit Arthrose untersucht [29]. Eine erhöhte Expression konnte in diesem Vergleich bei RA-Fibroblasten beobachtet werden [29]. In Untersuchungen vom Synovium des Kniegelenks konnte eine vermehrte Expression im Bereich der Gefäße, des *lining layer* und der Invasionszone sowie eine verminderte Expression im *sublining* festgestellt werden [29]. Diese Beobachtungen warfen die Frage auf, ob weitere Tetraspanine im Synovium bei Patienten mit rheumatoider Arthritis exprimiert und pathophysiologisch aktiv sein könnten, da Tetraspanine in bestimmten Bereichen der Membran angereichert vorkommen und so zur veränderten Zellbewegung beitragen können. Es wurden daher verschiedene Mitglieder aus der Familie der Tetraspanine für diese Dissertationsarbeit ausgewählt, deren Einfluss bei der Zellmotilität bekannt ist, und die Expression dieser Tetraspanine mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) getestet. In der PCR wurden die Tetraspanine Tspan 5, 10, 13, 24, 27, 28, 29 und 30 überprüft und die Tetraspanine CD9, CD63, CD81 und CD151 aufgrund des Expressionsprofils als am Vielversprechendsten identifiziert.

Ziel dieser Arbeit war, die Expression und Lokalisation der vier Tetraspanine CD9, CD63, CD81 und CD151 im Synovium von Patienten mit rheumatoider Arthritis zu charakterisieren. Dieses Ziel sollte durch die Darstellung mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz erreicht werden und beinhaltete die Etablierung der entsprechenden experimentellen Verfahren für die entsprechenden Tetraspanine. Weiterhin sollte die Tetraspanin-Expression nach Aktivierung synovialer Fibroblasten mittels Zellkultur und Real-Time-PCR untersucht werden. Als Vergleichsgruppe für sämtliche Versuche diente das Synovium von Patienten mit Arthrose, da die Gelenkzerstörung bei dieser Erkrankung durch einen degenerativen Prozess verursacht wurde und keine autoimmune Beteiligung vorliegt.

## 2. MATERIAL

Für die Durchführung der verschiedenen Versuche wurden unterschiedliche Materialien verwendet, welche in den folgenden Kapiteln dargestellt sind.

### 2.1 Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Materialien

Tab. 6: Verwendete allgemeine Chemikalien, Reagenzien und Materialien

| Substanz  | Hersteller             |
|---|------------------------|
| <b>Lösungsmittel</b>                                |                        |
| ddH <sub>2</sub> O                                  | Millipore              |
| Methanol Rotipuran                                  | Carl Roth              |
| Ethanol (vergällt)                                  | Carl Roth              |
| Aceton, ≥99,7 %, Ph.Eur., reinst                    | Carl Roth              |
| Xylol (Isomere), <98% rein für Histologie           | Carl Roth              |
| PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) (1x)            | Biochrom               |
| PBS (10x)   | Biochrom               |
| NaCl  | Carl Roth              |
| KCl   | Carl Roth              |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O | Carl Roth              |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | Merck                  |
| Tri-Sodium-Citrate-Dihydrat                         | Sigma                  |
| Tween20   | Carl Roth              |
| NaOH-Plättchen                                      | Carl Roth              |
| Salzsäure 32%                                       | Carl Roth              |
| <b>Einbettmedien</b>                                |                        |
| Tissue Tek O.C.T. Compound                          | Sakura                 |
| Roti®-Plast (Paraffin Pastillen)                    | Carl Roth              |
| <b>Entwicklungsmedien und Detektionssysteme</b>     |                        |
| DAPI-staining                                       | Sigma-Aldrich          |
| Strep HRP   | Jackson ImmunoResearch |
| AEC Substrate Kit, Peroxidase                       | Biozol                 |
| <b>Deckmedien</b>                                   |                        |
| Microscopy Entellan®                                | VWR                    |
| Kaisers Glyceringelatine                            | VWR                    |
| Fluorescence Mounting Medium                        | Dako                   |
| <b>Histologiezubehör</b>                            |                        |
| Objektträger Superfrost plus 25x75mm                | Langenbrinck           |
| Deckgläser 20x20mm                                  | Carl Roth              |
| Deckgläser 25x50mm                                  | Carl Roth              |
| Pap Pen Immunostaining Pen, Spitzendicke: 2 mm      | G. Kisker              |

Tab. 7: Für Hämatoxylin-Eosin-Färbung verwendete Reagenzien

| Substanz                       | Hersteller |
|--------------------------------|------------|
| Hämatoxylin                    | Carl Roth  |
| Natriumjodat NaJO <sub>3</sub> | Sigma      |
| Kaliumaluminiumsulfat          | Sigma      |
| Chloralhydrat                  | Sigma      |
| Zitronensäure-Monohydrat       | Sigma      |
| Eosin                          | Carl Roth  |

**Tab. 8: Verwendete Blocklösungen**

| Substanz                   | Hersteller   |
|----------------------------|--|
| BSA (2%, 5%, 10%)          | Carl Roth  |
| 10% FCS (Fetal Calf Serum) | Sigma-Aldrich                                      |
| 10% Hühnerserum            | Sigma  |
| 10 % BSA-Mix               | bestehend aus 10 % BSA, 10 % FCS, 10 % Hühnerserum |
| Wasserstoffperoxid 30%     | Carl Roth  |
| Milchpulver                | Carl Roth  |
| Ziegenserum                | Jackson Immuno Research                            |
| Kaninchenserum             | Jackson Immuno Research                            |

**Tab. 9: Für den ELISA verwendete Materialien und Substanzen**

| Material/Substanz                   | Hersteller |
|-------------------------------------|------------|
| Human IL-6 Quantikine ELISA Kit     | Bio-Techne |
| Gewebekulturplatte, 96 well, steril | Corning    |

**Tab. 10: Für die RNA-Isolation verwendete Materialien und Substanzen**

| Material/Substanz                | Hersteller |
|----------------------------------|------------|
| RNeasy® mini Kit                 | Qiagen     |
| Ethanol, extra pure (unvergällt) | Carl Roth  |
| B-Mercaptoethanol                | Merck      |

**Tab. 11: Für die cDNA-Synthese verwendete Materialien und Substanzen**

| Material/Substanz         | Hersteller |
|---------------------------|------------|
| AMV-RT-Puffer             | Promega    |
| PCR dNTP-Mix              | Sigma      |
| AMV Reverse Transkriptase | Promega    |
| Primer random Hexamer 2mg | Sigma      |
| RNasin Plus               | Promega    |

**Tab. 12: Für die Real-Time-PCR verwendete Materialien und Substanzen**

| Material/Substanz  | Hersteller   |
|--|--------------|
| SYBR Green Mix Thermo Fisher contains 3,0 mM mgCl <sub>2</sub> | ThermoFisher |
| Absolute qPCR SYBR Green Capillary Mix 2000 rxn a 20 µl        | ThermoFisher |
| MgCl Stock Sol (25 mM/L) 5x1,5 ml                              | Sigma        |
| qPCR Grade water   | ThermoFisher |

## 2.2 Herkunft der Gewebeproben

Sowohl die verwendeten Gewebeproben für die histologischen Färbungen als auch die verwendeten Zelllinien der synovialen Fibroblasten für Zellkultur und Real-Time-PCR wurden aus Synovium des Kniegelenks von Patienten mit gesicherter rheumatoider Arthritis bzw. Arthrose im Rahmen einer Kniegelenkersatz-OP gewonnen. Alle RA-Patienten erfüllten die Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology [16]. Entnommen wurden die Gewebeproben zwischen den Jahren 2012 und 2019 an den Universitätskliniken Gießen und Regensburg sowie in der orthopädischen Abteilung des Markus-Krankenhauses Frankfurt. Eine schriftliche Einwilligung aller Patienten in die Verwendung ihrer Gewebeproben und ein entsprechendes Ethikvotum der örtlichen Ethikkommission (Universität Regensburg und Justus-Liebig-Universität Gießen) liegen

vor.

Für die histologischen Untersuchungsmethoden wurden insgesamt 15 Proben von RA-Patienten und 15 von OA-Patienten eingeschlossen. Für die Zellversuche wurden Zellen von fünf RA-Patienten und fünf OA-Patienten verwendet. Dabei konnten Zellen von zwei OA-Patienten und einem RA-Patient eingeschlossen werden, deren Synovialgewebe parallel mittels der histologischen Methoden untersucht wurden. Zusätzlich wurden Zellen weiterer OA- bzw. RA-Patienten verwendet.

## 2.3 Antikörper

Im Rahmen der immunhistochemischen und Immunfluoreszenz-Färbungen wurden sieben Primärantikörper und sieben Sekundärantikörper zur Optimierung und Färbung verwendet (s. Tab. 13 und Tab. 14). Außerdem wurden drei verschiedenen Isotyp-Kontrollen genutzt (s. Tab. 15).

**Tab. 13: Verwendete Primärantikörper**

| Antikörper                         | Spezifität           | Typ            | Hersteller  |
|------------------------------------|----------------------|----------------|-------------|
| rabbit polyklonal antibody CD9     | Kaninchen Anti-Human | IgG polyklonal | biorbyt     |
| rabbit polyklonal antibody CD63    | Kaninchen Anti-Human | IgG polyklonal | proteintech |
| rabbit polyklonal antibody CD81    | Kaninchen Anti-Human | IgG polyklonal | biorbyt     |
| mouse monoklonal antibody CD81     | Maus Anti-Human      | IgG monoklonal | abcam       |
| rabbit anti-human CD82             | Kaninchen Anti-Human | IgG polyklonal | abcam       |
| rabbit polyklonal antibody CD151   | Kaninchen Anti-Human | IgG polyklonal | biorbyt     |
| Vimentin mouse monoklonal antibody | Maus Anti-Human      | IgG2ak         | Dako        |

**Tab. 14: Verwendete Sekundärantikörper**

| Antikörper            | Spezifität           | Typ                    | Hersteller             |
|-----------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
| Anti-Rabbit IgG       | Ziege Anti-Kaninchen | IgG polyklonal, Biotin | BD Pharmingen          |
| Alexa Fluor 546       | Ziege Anti-Kaninchen | IgG polyklonal         | ThermoFisher           |
| Alexa Fluor 488       | Ziege Anti-Maus      | IgG polyklonal         | ThermoFisher           |
| Dylight 649           | Esel Anti-Kaninchen  | IgG polyklonal         | BioLegend              |
| Cy3 Goat Anti-Rabbit  | Ziege Anti-Kaninchen | IgG                    | Jackson ImmunoResearch |
| FITC Goat Anti-Rabbit | Ziege Anti-Kaninchen | IgG polyklonal         | abcam                  |

**Tab. 15: Verwendete Isotypkontrollen**

| Antikörper                  | Spezifität           | Typ               | Hersteller    |
|-----------------------------|----------------------|-------------------|---------------|
| rabbit IgG Isotyp control   | Kaninchen Anti-Human | IgG monoklonal    | abcam         |
| rabbit IgG Isotyp control   | Kaninchen Anti-Human | IgG polyklonal    | biorbyt       |
| mouse IgG2a isotype control | Maus Anti-Human      | IgG2ak monoklonal | BD Pharmingen |

## 2.5 Primer

Die benötigten mRNA-Sequenzen der Tetraspanine wurden in der Literatur recherchiert und die Spezifität der Primersequenzen verifiziert. Die verwendeten Primer und ihre Sequenzen sind in Tab. 16 dargestellt.

**Tab. 16: Verwendete Primer**

| Gen                                   | Sequenz   | MgCl <sub>2</sub> (mM) | Temperatur (°C) |
|---------------------------------------|---|------------------------|-----------------|
| CD9 (vorwärts)<br>CD9 (rückwärts)     | TCGCCATTGAAATAGCTGCGGC<br>CGCATAGTGGATGGCTTTCAGC  | nicht verwendet        | nicht verwendet |
| CD63 (vorwärts)<br>CD63 (rückwärts)   | CAACCACACTGCTTCGATCCTG<br>GACTCGGTTCTTCGACATGGAAG | 5,0                    | 48              |
| CD81 (vorwärts)<br>CD81 (rückwärts)   | CTGCTTTGACCACCTCAGTGCT<br>TGGCAGCAATGCCGATGAGGTA  | 3,0                    | 49              |
| CD151 (vorwärts)<br>CD151 (rückwärts) | GGAGAACCTGAAGGACACCATG<br>CAGTCCTGTGAGTTGTTGCTGC  | 3,0                    | 58              |

## 2.6 Für die Zellkultur verwendete Materialien

**Tab. 17: Für Zellkultur verwendete Materialien und Substanzen**

| Material/Substanz  | Hersteller      |
|--|-----------------|
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 1 g/l Glucose, mit L-Glutamin | GE Healthcare   |
| 10% FCS (Fetal Calf Serum)   | Sigma           |
| 1% Penicillin/Streptomycin (P/S)   | Omnilab         |
| 1% HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)         | GE Healthcare   |
| Typsin/EDTA  | Capricorn       |
| Interleukin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )                                    | bio-techne      |
| Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )                            | peprotech       |
| $\beta$ Mercaptoethanol  | Merck           |
| T75-Flasche  | Greiner bio-one |
| Gewebekulturplatte (wells)   | Corning         |
| Einfriervials (Cryo.Vials TM)  | Greiner bio-one |

**Tab. 18: Für die Zellkultur verwendete Lösungen**

| Lösungen           | Zusammensetzung                                    |
|--------------------|--|
| Fibroblastenmedium | Grundmedium DMEM, 10 % FCS, 1 U/ml P/S, 1 mM HEPES |
| Einfriermedium     | 9 ml FCS, 1 ml DMSO                                |

## 2.7 Geräte

**Tab. 19: Verwendete Geräte und Programme**

| Gerätetyp/Programm                | Hersteller                  |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Kryostat CM3050S                  | Leica                       |
| Multifuge 3 S-R                   | Heraeus                     |
| Mikroskop Leica CTR6000           | Leica                       |
| Mikroskop Software Leica V4.9     | Leica Application Suite     |
| Microsoft Fotos 2020              | 2020 Microsoft Corporation  |
| Brutschrank (C150)                | Binder GmbH, Tuttlingen     |
| Rotationsschüttler (Unimax 1011)  | Heidolph Instruments        |
| GeneAmp PCR System 9700           | PE Applied Biosystems       |
| Nanodrop Spectrophotometer ND1000 | Nanodrop                    |
| Light Cycler 1,5                  | Roche                       |
| Light Cycler Software 4.1         | Light Cycler 3 Front Screen |
| GraphPad Prism 6 und 8            | GraphPad Prism              |
| Microsoft Office Word und Excel   | Microsoft Corporation       |

### **3. Methoden**

Bei vielen der im Folgenden beschriebenen Verfahren handelt es sich um etablierte Methoden, die im Rahmen der Promotionsarbeit an die jeweilige Fragestellung adaptiert wurden. Die Etablierung der immunhistochemischen und Immunfluoreszenz-Färbung für die Tetraspanine CD9, CD63, CD81 und CD151, deren Auswertung, die Entwicklung und Anwendung der beschriebenen Scores und Korrelationen sowie deren Auswertung, als auch Ausführung der Zellstimulierung der RASF und OASF (OA-synoviale Fibroblasten) bis hin zur Real-Time-PCR und ihrer Auswertung wurden von der Promovendin durchgeführt.

#### **3.1 Histologische Methoden**

##### **3.1.1 Verwendete Gewebeproben**

Die im Rahmen von Kniegelenkersatz-Operationen entnommenen Gewebeproben wurden anhand von Standardprotokollen der Arbeitsgruppe nach der OP in Behältnissen mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) zur Weiterverarbeitung nach Bad Nauheim gebracht. Dort wurde das Synovium mittels Skalpells von Knochen oder Knorpel getrennt und in etwa 1 mm<sup>3</sup> große Gewebestücke geschnitten. Anschließend wurden die Gewebeproben sowohl zur Gewinnung humaner synovialer Fibroblasten weiterverarbeitet als auch für die histologischen Untersuchungen entweder in Paraffin eingebettet oder in OCT TissueTek Einfriermedium mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren. Die verwendeten Gewebe lagen in der Gewebe- und Zellbank in Bad Nauheim vor.

##### **3.1.2 Anfertigen von Gefrierschnitten**

Das in TissueTek eingefrorene Gewebe wurde mittels Kryostat bei einer Temperatur von -15 bis -20 °C zu 5 µm dicken Serienschnitten weiterverarbeitet und anschließend auf einem Objektträger für zehn Minuten in Aceton fixiert. Nach kurzem Abdampfen des Acetons wurden die angefertigten Schnitte entweder direkt für anschließende Färbungen verwendet oder bis zu ihrem späteren Einsatz bei -20°C gelagert.

##### **3.1.3 Anfertigung von Paraffinschnitten**

Gewebeproben von Lunge, Gehirn, Niere und Fettgewebe wurden als Kontrollgewebe nach der Entnahme zunächst durch eine aufsteigende Ethanolreihe schrittweise dehydriert. Daraufhin wurde das Gewebe bei 60 °C in Paraffin getränkt und in einer passenden Einbettform bei Raumtemperatur ausgehärtet und lagen in der Gewebebank

vor. Mittels eines Rotationsmikrotoms wurden von den in den Paraffinblöcken befindlichen Geweben 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Die Schnitte glitten daraufhin in ein 40 °C warmes Wasserbad, wo sie auf einen Objektträger überführt wurden. Anschließend wurden die Objektträger getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert.

### **3.1.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Zur Beurteilung der verwendeten Gewebeproben wurden sowohl für die Paraffin- als auch für die Gefrierschnitte jeweils Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (H/E-Färbung) angefertigt. Die Paraffinschnitte wurden zunächst durch eine Reihe aus zweimal Xylol (10 min) und einer absteigenden Ethanolreihe (je 10 min 100%, 96% Ethanol (EtOH) und je 5 min 80%, 70%, 50% EtOH) entparaffiniert und anschließend für fünf Minuten in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) getaucht. Für Gefrierschnitte entfielen die vorbereitenden Schritte und es konnte direkt mit dem fünf-minütigen Eintauchen in PBS begonnen werden. Es folgte jeweils eine siebenminütige Färbung mit Hämalaun und Eosin, nach der sich jeweils ein Waschgang mit Leitungswasser anschloss. Zum Dehydrieren wurde eine aufsteigende Reihe von Ethanol (je 5min 50%, 70%, 96%, 100% EtOH) und dreimal vier Minuten Xylol durchlaufen. Eingedeckelt wurde mittels Entellan.

### **3.2 Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie (IHC) beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei bindet ein konjugierter Antikörper spezifisch nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an das entsprechende Epitop des Antigens. Im nächsten Schritt bindet ein Sekundärantikörper an das Fc-Fragment des Primär-Antiköpers. Die hier durchgeführte Immunhistochemie folgt dem Prinzip einer indirekten Immunhistochemie. Dabei sorgt das mit einem enzymgekoppelten Sekundär-AK konjugierte Chromogen mittels einer entsprechenden Farbreaktion für ein Signal am Ort des Epitops. Mit dem verwendeten Detektionssystem einer indirekten IHC ermöglicht man eine Signalverstärkung, die bei einer direkten Methode nicht gegeben ist [99–101].

Im Folgenden wird das allgemein für die Immunhistochemie verwendete Protokoll beschrieben (Zusammenfassung s. Tab. 20). Auf variierende Parameter wird hingewiesen und diese anschließend in den Kapiteln des Ergebnisteils zur Etablierung der verschiedenen Tetraspanine genauer erläutert (s. Kapitel 4.1.1.1, 4.1.2.1, 4.1.3.1 und 4.1.4).

**Tab. 20: Allgemeines Immunhistochemie-Protokoll**

Dargestellt ist das allgemein verwendete IHC-Protokoll. Im Rahmen der Etablierung variierende Parameter sind mit blau markiert und werden anschließend in den Kapiteln des Ergebnisteils zur Etablierung der verschiedenen Tetraspanine genauer erläutert.

| 1. Tag   | 2. Tag  |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kryoschnitte kurz auftauen lassen, Paraffinschnitte entparaffinieren, dann 5 Minuten rehydrieren</li> <li>• Peroxidase Block (70 ml MeOH + 700 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 Minuten bei 4°C</li> <li>• 2x 5 Minuten in PBS waschen</li> <li>• Blocken: mit <i>Blocklösung</i> 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (feuchte Kammer)</li> <li>• Auftragen von Negativkontrolle, Isotypkontrolle bzw. Antikörper (jeweils ca. 100 µl/Schnitt):             <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Negativkontrolle</u>: 100 µl PBS</li> <li>• <u>Isotypkontrolle</u>:</li> <li>• <i>Isotypkontroll-Antikörper</i>,</li> <li>• Verdünnung 1:x in <i>Lösungsmittel</i></li> <li>• <u>Antikörper</u>: <i>Tetraspanin-Antikörper</i>, Verdünnung 1:x in <i>Lösungsmittel</i></li> </ul> </li> <li>• Über Nacht bei 4°C inkubieren (feuchte Kammer)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2x 3 Minuten in PBS waschen, trockenwischen</li> <li>• Sekundärantikörper 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (feuchte Kammer):             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rabbit IgG in goat; BD Pharmingen;</li> <li>• 125 µg/ml; Verdünnung 1:200 in PBS</li> </ul> </li> <li>• Strep HRP 30 Minuten HRP bei Raumtemperatur inkubieren (feuchte Kammer):             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Jackson Immuno Research;</li> <li>• Verdünnung 1:500 in PBS</li> </ul> </li> <li>• 2x 3 Minuten in PBS waschen, trockenwischen</li> <li>• Entwickeln mittels AEC Substrate Kit (nach Herstellerprotokoll von Biozol, ca. 100 µl/Schnitt)             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Entwicklung unter dem Mikroskop beobachten</li> <li>• möglichst gleichzeitiges Abstoppen aller Schnitte nach x Minuten in einer Küvette mit PBS für mind. 5 Minuten</li> </ul> </li> <li>• Auftragen von Glycerin-gelatine (VWR) und Deckglas</li> </ul> |

Für eine immunhistochemische Färbung wurden die Kryoschnitte nach kurzem Auftauen für fünf Minuten rehydriert. Paraffinschnitte wurden, wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, vorher entparaffiniert. Daraufhin wurden die Schnitte einem Peroxidase-Block (70 ml MeOH + 700 µl 30 %-iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 30 Minuten bei 4 °C zugeführt. Auf diese Weise sollte eine endogene Enzymaktivität mit Umsetzung des Chromogens im Gewebe verhindert werden [100, 101].

Es folgte ein zweimaliger Waschschrift in PBS für fünf Minuten. PBS ist eine phosphatgepufferte Salzlösung mit den Eigenschaften eines konstanten pH-Wertes und eines osmotischen Drucks des menschlichen Organismus im Sinne einer isotonischen Salzlösung, welche für Zellen nicht schädlich ist [100, 101].

Anschließend wurde ein Blocken unspezifischer Bindungen in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für eine Stunde durchgeführt. Die beim Blocken verwendete Substanz konkurriert durch ihre Bindung an die Oberfläche und der Absättigung von

elektrostatischen Ladungen der Proteine mit der unspezifischen Bindung des Nachweisantikörpers und verhindert diese. Somit wird ein unspezifisches Hintergrundsignal vermindert. Dabei liegt die Blocklösung im Verhältnis zum Nachweisantikörper im Überschuss vor. Verwendet werden Normalseren wie beispielsweise Milchpulver oder BSA (bovines Serumalbumin), welche keine spezifischen Antikörper gegen gesuchte Antigene besitzen [99–101]. Die verwendete Blocklösung und -konzentration wurde während der Etablierung und zwischen den verschiedenen Tetraspaninen zur Etablierung variiert. Welche Substanzen während der Etablierung getestet wurden, ist in Tab. 8 zusammengefasst.

Nach dem Blocken wurden Negativkontrolle ohne Primärantikörper (100 µl PBS), Isotypkontrolle oder Antikörper (je 100 µl pro Schnitt) auf das Gewebe aufgetragen und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Auf die Negativkontrolle wurde ausschließlich das Lösungsmittel, in welchem die Primär-AK gelöst wurden, ohne einen Primär-AK aufgetragen. Dies diente dazu, unspezifische Bindungen des Detektions-Systems aufzudecken. Als Isotypkontrolle wurden Primär-AK aufgetragen, welche den Arten der schweren Kette (IgG), der Unterklasse und der leichten Kette des Nachweisantikörpers entsprachen. Sie wurde dabei in einer mit der Antikörperkonzentration übereinstimmenden Verdünnung aufgetragen. Isotypkontrollen dienten als Negativkontrollen, die das Ausmaß der unspezifischen Bindungen des Nachweisantikörpers an die untersuchten Gewebe oder Zellen in Form von Hintergrundsignalen aufzeigen sollten. Auch auf eine übereinstimmende Herstellung der Antikörperseren wurde geachtet. Unterschieden wurde zwischen monoklonalen Antikörpern, welche nur ein Epitop des Antigens erkennen, und polyklonalen Antikörpern, welche gegen mehrere Epitope des Antigens gerichtet sind [99–101]. Die verwendeten Primärantikörper und ihre eingesetzten Konzentrationen variierten während der Etablierung der jeweiligen Tetraspaninfärbungen.

Auf die Übernacht-Inkubation folgte ein weiterer Waschschrift in PBS für fünf Minuten und anschließend eine einstündige Inkubation aller Schnitte mit dem Sekundärantikörper in einer Feuchtekammer bei Raumtemperatur. Verwendet wurden in Ziege generierte Anti-Kaninchen IgG-Antikörper (BD Pharmingen, 125 µg/ml) in einer Verdünnung von 1:200. In diesem Schritt bindet der Sekundärantikörper, welcher gegen die Spezies der Primärantikörper sowohl der Isotypkontrolle als auch des jeweiligen Tetraspanins gerichtet ist, an diese.

Darauf folgte eine weitere Inkubation mit HRP-konjugiertem Streptavidin (Jackson ImmunoResearch) mit einer Verdünnung von 1:500 in der Feuchtekammer bei Raumtemperatur. Streptavidin HRP (*horseradish peroxidase*) ist hierbei mehrfach an

den Sekundär-AK konjugiert und stellt die Verbindung zwischen Sekundär-AK und Chromogen dar. So erhält jeder einzelne Sekundär-AK mehrere signalgebende Moleküle, die zur Signalverstärkung führen.

Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Gewebeschnitte mit dem Detektions-Kit AEC (nach Herstellerprotokoll von Biozol angefertigt) entwickelt. AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol) ist als Chromogen für das generierte rote Signal verantwortlich. Die Farbentwicklung wurde unter dem Mikroskop beobachtet und die Reaktion nach vollständigem Ablauf in allen Gewebeschnitten nach der gleichen Zeit abgestoppt. Die Zeit wurde ab Hinzupipettieren des AEC bis zum Abstoppen gemessen. Sie variierte zwischen den unterschiedlichen Etablierungs-Varianten der jeweiligen Tetraspanine und wurde jeweils notiert. Nachdem die Reaktion in den Gewebeschnitten für fünf Minuten in PBS abgestoppt wurde, folgte das Abdecken der Schnitte mit Kaisers Glyceringelantine (VWR) sowie einem Deckglas. Im Rahmen der Etablierungsschritte zu den verschiedenen Tetraspaninen wurde das hier beschriebene Basisprotokoll an verschiedenen Stellen variiert. Zu den Variablen gehörten Blocking, Inkubationsdauer, Umgebungstemperatur bei Inkubation, Isotypkontrolle, Primär-AK, verwendetes Sekundärsystem, Gewebetyp und Fixierung. Inkubationen erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, immer bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer.

### **3.3 Immunfluoreszenz**

Die Immunfluoreszenz (IF) ist eine Variante der Immunhistochemie. Sie beruht ebenso wie die IHC auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, jedoch wird ein anderes Detektionsprinzip verwendet. Das mit dem Sekundär-AK gekoppelte Detektionssystem funktioniert bei der Immunfluoreszenz mittels einer relativ schnell abklingenden Lichtemission durch Atome oder Moleküle, die durch Absorption energiereicher Strahlen angeregt wurden und diese Energie teilweise als längerwellige Strahlung wieder abgeben. Hierfür wurden die Gewebeschnitte mit speziellen Fluoreszenzfarbstoffen, sogenannten Fluorochromen angefärbt [99, 101, 102].

Im Folgenden wird das allgemein für die Immunfluoreszenz verwendete Protokoll beschrieben (Zusammenfassung s. Tab. 21). Auf variierende Parameter wird hingewiesen und diese anschließend in den Kapiteln des Ergebnisteils zur Etablierung der verschiedenen Tetraspanine genauer erläutert (s. Kapitel 4.1.1.3, 4.1.2.2 und 4.1.3.2). Die endgültig etablierten Substanzen und Konzentrationen finden sich in Tab. 22 bis Tab. 24).

**Tab. 21: Allgemeines Immunfluoreszenz-Protokoll**

Dargestellt ist das allgemein verwendete Immunfluoreszenz-Protokoll. Im Rahmen der Etablierung variierende Parameter sind mit **blau** markiert und werden anschließend in den Kapiteln des Ergebnisteils zur Etablierung der verschiedenen Tetraspanine genauer erläutert.

| 1. Tag  | 2. Tag   |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kryoschnitte kurz auftauen lassen, Paraffinschnitte entparaffinieren, dann 5 Minuten rehydrieren</li> <li>• Blocken: mit <i>Blocklösung</i> 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (feuchte Kammer)</li> <li>• Auftragen von Negativkontrolle, Isotypkontrolle bzw. Antikörper (jeweils ca. 100 µl/Schnitt):             <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Negativkontrolle</u>: 100 µl PBS</li> <li>• <u>Isotypkontrolle</u>: <i>Isotypkontroll-Antikörper</i>, Verdünnung 1:x in <i>Lösungsmittel</i></li> <li>• <u>Antikörper</u>: <i>Tetraspanin-Antikörper</i>, Verdünnung 1:x in <i>Lösungsmittel</i></li> </ul> </li> <li>• Über Nacht bei 4°C inkubieren (feuchte Kammer)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2x 3 Minuten in PBS waschen, trocken wischen</li> <li>• Sekundär-Antikörper 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (feuchte Kammer):             <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Sekundärantikörper</u>: <i>Sekundärantikörper</i>,</li> <li>• Verdünnung 1:x in <i>Lösungsmittel</i></li> </ul> </li> <li>• 2x 3 Minuten in PBS waschen, trocken wischen</li> <li>• Entwickeln mittels DAPI-Lösung (Sigma-Aldrich, ca. 100 µl/Schnitt)             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verdünnung 1:5000 in Methanol</li> <li>• Abstoppen aller Schnitte nach 10 Sekunden in einer Küvette mit PBS für mind. 5 Minuten</li> </ul> </li> <li>• Auftragen von Fluorescence Mounting Medium (Dako) und Deckgläschen</li> </ul> |

Für eine Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Kryoschnitte nach kurzem Antauen für fünf Minuten in PBS rehydriert. Anschließend folgte ein Blocken der unspezifischen Bindungen für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Die verwendeten Substanzen und Konzentrationen variierten je Tetraspanin und Etablierungs-Protokoll. Als nächstes folgten das Auftragen von Negativkontrolle (100 µl PBS), Isotypkontrolle oder Antikörper (je 100 µl pro Schnitt) sowie eine Übernacht-Inkubation in einer feuchten Kammer bei 4 °C. Während der Etablierung variierten die verwendeten Antikörper und die eingesetzte Verdünnung. Der Isotypantikörper wurde bezüglich seiner Eigenschaften passend für den jeweiligen Tetraspaninantikörper gewählt und in einer mit der Antikörper-Konzentration übereinstimmenden Verdünnung aufgetragen. Nach der Inkubation des Primärantikörpers wurden die Objektträger zweimal für drei Minuten in PBS gewaschen und danach einer einstündigen Inkubation mit einem Sekundärantikörper (je 100 µl pro Schnitt) in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur unterzogen. Der Sekundärantikörper trägt bei der Immunfluoreszenz das Fluorochrom, welches später für das entsprechende farbige Signal am Ort des Epitops verantwortlich ist [100, 101]. Auch die Sekundärantikörper variierten zwischen den Tetraspaninen und deren Etablierungsprozessen.

Nach einem weiteren zweimaligen Waschschrift mit PBS für drei Minuten folgte die

Kernfärbung mittels DAPI-Lösung (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Sigma-Aldrich), welches mit einer Verdünnung von 1:5000 in Methanol mit je 100 µl pro Schnitt aufgetragen wurde. DAPI stellt einen blau fluoreszierenden Farbstoff dar und wird zur Markierung der DNA eingesetzt. Hierdurch wird eine Färbung aller im Gewebe vorhandenen Zellkerne und damit die Identifizierung von Zellen ermöglicht [99]. Nach zehn Sekunden wurde die Reaktion in PBS abgestoppt und die Gewebeproben anschließend mit Fluorescence Mounting Medium (Dako) und einem Deckgläschen verschlossen. Die fertigen Schnitte wurden bei 4 °C und vor Licht geschützt gelagert, um das Abschwächen der fluoreszierenden Signale durch UV-Strahlung zu vermeiden. Da die Färbung trotzdem mit zunehmender Zeit an Signal verlor, wurden die Immunfluoreszenz-Färbungen nach Möglichkeit am Folgetag mittels Mikroskop und digitaler Kamera fotografiert und dokumentiert. Bei der Mikroskopie von Immunfluoreszenz-Färbungen wurden die auf dem Gewebe gebundenen Fluorochrome mit entsprechendem Licht angeregt und es zeigten sich die für die Fluoreszenzfarbstoffe typischen Emissionen.

**Tab. 22: Für die CD63-Immunfluoreszenz etablierte Substanzen und Konzentrationen**

| Antikörper                    | Hersteller              | Spezifizierung                      | Ausgangskonz. | Verdünnung   |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|---------------|--------------|
| <b>Blocken</b>                |                         |                                     |               |              |
| Milchpulver                   | Carl Roth               |                                     |               | 1:20 in PBS  |
| <b>Isotypkontrolle</b>        |                         |                                     |               |              |
| Rabbit IgG Isotyp control     | biorbyt                 | Kaninchen Anti-Human IgG polyklonal | 1 mg/ml       | 1:900 in PBS |
| <b>Tetraspanin-Antikörper</b> |                         |                                     |               |              |
| Antibody CD63                 | proteintech             | Kaninchen Anti-Human IgG polyklonal | 0,333 mg/ml   | 1:300 in PBS |
| <b>Sekundär-Antikörper</b>    |                         |                                     |               |              |
| Cy3 Goat Anti-Rabbit          | Jackson Immuno-Research | Ziege Anti-Kaninchen                | 1,5 mg/ml     | 1:250 in PBS |

**Tab. 23: Für die CD81-Immunfluoreszenz etablierte Substanzen und Konzentrationen**

| Antikörper                    | Hersteller    | Spezifizierung                    | Ausgangskonz. | Verdünnung    |
|-------------------------------|---------------|-----------------------------------|---------------|---------------|
| <b>Blocken</b>                |               |                                   |               |               |
| BSA                           | Carl Roth     |                                   |               | 1:20 in PBS   |
| <b>Isotypkontrolle</b>        |               |                                   |               |               |
| Mouse IgG2a Isotype control   | BD Pharmingen | Maus Anti-Human IgG2ak monoklonal | 250 µg/ml     | 1:250 in PBS  |
| <b>Tetraspanin-Antikörper</b> |               |                                   |               |               |
| Antibody CD81                 | abcam         | Maus Anti-Human IgG monoklonal    | 1 mg/ml       | 1:1000 in PBS |
| <b>Sekundär-Antikörper</b>    |               |                                   |               |               |
| Alexa Fluor 488               | ThermoFisher  | Ziege Anti-Maus IgG polyklonal    | 2 mg/ml       | 1:500 in PBS  |

**Tab. 24: Für die CD151-Immunfluoreszenz etablierte Substanzen und Konzentrationen**

| Antikörper                    | Hersteller             | Spezifizierung                      | Ausgangs-konz. | Verdünnung   |
|-------------------------------|------------------------|-------------------------------------|----------------|--------------|
| <b>Blocken</b>                |                        |                                     |                |              |
| Milchpulver                   | Carl Roth              |                                     |                | 1:20 in PBS  |
| <b>Isotypkontrolle</b>        |                        |                                     |                |              |
| Rabbit IgG Isotyp control     | biorbyt                | Kaninchen Anti-Human IgG polyklonal | 1 mg/ml        | 1:900 in PBS |
| <b>Tetraspanin-Antikörper</b> |                        |                                     |                |              |
| Antibody CD151                | biorbyt                | Kaninchen Anti-Human IgG polyklonal | 0,5 mg/ml      | 1:450 in PBS |
| <b>Sekundär-Antikörper</b>    |                        |                                     |                |              |
| Cy3 Goat Anti-Rabbit          | Jackson ImmunoResearch | Ziege Anti-Kaninchen                | 1,5 mg/ml      | 1:250 in PBS |

### 3.4 Doppel-Immunfluoreszenz

Im Folgenden wird das für die Doppel-Immunfluoreszenz verwendete Protokoll beschrieben (Zusammenfassung s. Tab. 25). Alle Substanzen und ihre Konzentrationen sind in Tab. 26 aufgeführt.

**Tab. 25: Protokoll der Doppel-Immunfluoreszenz von CD81 und CD151**

Dargestellt ist das verwendete Protokoll zur Doppel-Immunfluoreszenz von CD81 und CD151. Die verwendeten Sekundärantikörper fluoreszieren in grün oder rot. Spezifisch durch den jeweiligen Sekundärantikörper gebundene Primärantikörper sind entsprechend farblich markiert.

| 1. Tag  | 2. Tag   |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kryoschnitte kurz auftauen lassen, dann 5 Minuten rehydrieren</li> <li>• Blocken: mit 5 % BSA oder 5 % Milchpulver 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (feuchte Kammer)</li> <li>• Auftragen von Negativkontrolle, Isotypkontrollen bzw. Antikörpern (jeweils ca. 100 µl/Schnitt):             <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Negativkontrolle:</u> 100 µl PBS</li> <li>• <u>Isotypkontrolle:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Mouse IgG2a Isotyp control</b>, Verdünnung 1:250 in PBS</li> <li>• <b>Kaninchen IgG Isotyp control</b>, Verdünnung 1:900 in PBS</li> </ul> </li> <li>• <u>Antikörper:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Antibody CD81</b>, Verdünnung 1:1000 in PBS</li> <li>• <b>Antibody CD151</b>, Verdünnung 1:450 in PBS</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>• Über Nacht bei 4°C inkubieren (feuchte Kammer)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2x 3 Minuten in PBS waschen, trockenwischen</li> <li>• Sekundär-Antikörper 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (feuchte Kammer):             <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Alexa Fluor 488</b>, Verdünnung 1:500 in PBS</li> <li>• <b>Cy3 Goat Anti-Rabbit</b>, Verdünnung 1:250 in PBS</li> </ul> </li> <li>• 2x 3 Minuten in PBS waschen, trockenwischen</li> <li>• Entwickeln mittels DAPI-Lösung (Sigma-Aldrich, ca. 100 µl/Schnitt)             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verdünnung 1:5000 in Methanol</li> <li>• Abstoppen aller Schnitte nach 10 Sekunden in einer Küvette mit PBS für mind. 5 Minuten</li> </ul> </li> <li>• Auftragen von Fluorescence Mounting Medium (Dako) und Deckgläschen</li> </ul> |

Für die Doppel-IF von CD81 und CD151 wurden die Kryoschnitte kurz angetaut und für fünf Minuten in PBS rehydriert. Anschließend wurden unspezifische Bindungen mittels

Inkubation mit 5 % Milchpulver oder 5 % BSA (bovines Serumalbumin/Rinderalbumin) in einer feuchten Kammer für eine Stunde geblockt. Als nächster Schritt folgte die Inkubation mit Negativkontrolle (100 µl PBS), Isotypkontrollen oder Antikörpern (je 100 µl pro Schnitt) in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht. Nach der Übernacht-Inkubation wurden die Schnitte zweimal für drei Minuten in PBS gewaschen und dann für eine Stunde mit den Sekundärantikörpern in einer feuchten Kammer inkubiert. Daraufhin folgte ein weiterer zweimaliger Waschschrift in PBS. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mittels DAPI-Lösung (Verdünnung 1:5000 in Methanol) mit je 100 µl pro Schnitt gefärbt. Die Reaktion wurde nach zehn Sekunden in PBS abgestoppt. Es folgte das Auftragen von Fluorescence Mounting Medium und eine lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurden die Ergebnisse mittels Mikroskop fotografisch dokumentiert.

**Tab. 26: Für Doppel-Immunfluoreszenz CD81/ 151 etablierte Substanzen und Konzentrationen**

Die verwendeten Sekundär-AK fluoreszieren in grün oder rot. Spezifisch durch den jeweiligen Sekundär-AK gebundene Primär-AK sind entsprechend farblich markiert.

| Antikörper                     | Hersteller                | Spezifizierung                         | Ausgangs-konz. | Verdünnung       |
|--------------------------------|---------------------------|--|----------------|------------------|
| <b>Blocken</b>                 |                           |  |                |                  |
| Milchpulver                    | Carl Roth                 |  |                | 1:20 in PBS      |
| BSA                            | Carl Roth                 |  |                | 1:20 in PBS      |
| <b>Isotypkontrolle</b>         |                           |  |                |                  |
| Mouse IgG2a<br>Isotype control | BD Pharmingen             | Maus Anti-Human<br>IgG2ak monoklonal   | 250 µg/ml      | 1:250 in PBS     |
| Rabbit IgG<br>Isotyp control   | biorbyt                   | Kaninchen Anti-Human<br>IgG polyklonal | 1 mg/ml        | 1:900 in PBS     |
| <b>Primär-AK</b>               |                           |  |                |                  |
| Antibody CD81                  | abcam                     | Maus Anti-Human<br>IgG monoklonal      | 1 mg/ml        | 1:1000 in<br>PBS |
| Antibody<br>CD151              | biorbyt                   | Kaninchen Anti-Human<br>IgG polyklonal | 0,5 mg/ml      | 1:450 in PBS     |
| <b>Sekundär-AK</b>             |                           |  |                |                  |
| Alexa Fluor<br>488             | ThermoFisher              | Ziege Anti-Maus<br>IgG polyklonal      | 2 mg/ml        | 1:500 in PBS     |
| Cy3 Goat<br>Anti-Rabbit        | Jackson<br>ImmunoResearch | Ziege Anti-Kaninchen                   | 1,5 mg/ml      | 1:250 in PBS     |

### 3.5 Mikroskopische Dokumentation

Die Dokumentation der histologischen Färbungen erfolgte unter einem Mikroskop mit digitaler Kamera (Leica CTR6000) und der Software Leica V4.9 bei Raumtemperatur. Das Gewebe wurde mit kleinster Vergrößerung (100x mittels 10x-Objektiv) vollständig fotografiert und besonders interessante Bereiche in größeren Vergrößerungen (200x und 400x mittels 20x- und 40x-Objektiv) festgehalten. Um die verschiedenen Gewebeschnitte miteinander vergleichen zu können, wurden die Proben bei den

unterschiedlichen Färbungen der Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und Doppel-IF jeweils mit gleichen Belichtungseinstellungen innerhalb einer Vergrößerung, gleichem Mikroskop sowie denselben Umgebungsbedingungen fotografiert. Die für die Auswertung verwendeten Mikroskop-Einstellungen sind in Tab. 27 aufgeführt.

**Tab. 27: Mikroskopeinstellungen**

| <b>Immunhistochemie CD63 und CD151</b>   |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Allgemein:</b> Verstärkung 1,0x; Sättigung 1,0; Gamma 0,6; INT (Mikroskop) 11; Blende (Mikroskop) 8; FD (Mikroskop) 6 O (Kreis); Weißabgleich anhand der Negativkontrolle</li> <li>• <b>Belichtung:</b> 5x: 22,5 ms; 10x: 16,0 ms; 20x: 54,1 ms; 40x: 54,1 ms (erneuter Weißabgleich notwendig)</li> </ul>   |
| <b>Immunfluoreszenz CD63, CD81 und CD151</b>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Allgemein:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verstärkung 1,0x; Blende (Mikroskop) 8; FD (Mikroskop) 6 O (Kreis)</li> <li>• <u>Pseudofarbe:</u> DAPI: 446 nm; GFP: 518 nm; Y3: 780 nm</li> </ul> </li> <li>• <b>10x und 20x:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Phasenkontrast:</u> Belichtung 16,5 ms; Gamma 0,6; INT (Mikroskop) 11</li> <li>• <u>DAPI, GFP, Y3 allgemein:</u> Belichtung 1,0 s; Gamma 1,0</li> <li>• <u>FIM (Mikroskop):</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>CD63 und CD81:</u> DAPI, GFP, Y3: 55 %</li> <li>• <u>CD151:</u> DAPI: 55 %; Y3: 100 %</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>• <b>40x:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>DAPI, GFP, Y3 allgemein:</u> Belichtung 1,0 s; Gamma 1,0</li> <li>• <u>FIM (Mikroskop):</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>CD63:</u> DAPI und Y3: 30 %</li> <li>• <u>CD81:</u> DAPI: 17 %; GFP: 30 %</li> <li>• <u>CD151:</u> DAPI: 30 %; Y3: 55 %</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> |
| <b>Doppel-Immunfluoreszenz CD81 und CD151</b>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Allgemein:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verstärkung 1,0x; Blende (Mikroskop) 8; FD (Mikroskop) 6 O (Kreis)</li> <li>• <u>Pseudofarbe:</u> DAPI: 446 nm; GFP: 518 nm; Y3: 780 nm</li> </ul> </li> <li>• <b>10x:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Phasenkontrast:</u> Belichtung 16,5 ms; Gamma 0,6; INT (Mikroskop) 11</li> <li>• <u>DAPI, GFP, Y3 allgemein:</u> Belichtung 1,0 s; Gamma 1,0</li> <li>• <u>FIM (Mikroskop):</u> DAPI: 30 %; GFP: 30 %; Y3: 100 %</li> </ul> </li> <li>• <b>20x:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>DAPI, GFP, Y3 allgemein:</u> Belichtung 1,0 s; Gamma 1,0</li> <li>• <u>FIM (Mikroskop):</u> DAPI: 55 %; GFP: 30 %; Y3: 100 %</li> </ul> </li> <li>• <b>40x:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>DAPI, GFP, Y3 allgemein:</u> Belichtung 1,0 s; Gamma 1,0</li> <li>• <u>FIM (Mikroskop):</u> DAPI: 30 %; GFP: 30 %; Y3: 55 %</li> </ul> </li> </ul>  |

Bei der Immunhistochemie wurde der Weißabgleich anhand der Negativkontrolle eingestellt. Immunfluoreszenz- und Doppel-IF-Färbungen wurden in einer Dunkelkammer fotografiert, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzsignals zu vermeiden. Die verschiedenen verwendeten Fluorochrome, welche unterschiedliche Absorptions- und Emissionseigenschaften besitzen, wurden mit entsprechenden Wellenlängen

angeregt (siehe Tab. 27). Um ein Überprüfen der Gewebestruktur der einzelnen Schnitte zu ermöglichen, wurde jede Gewebeprobe mittels Phasenkontrast fotografiert.

### **3.6 Zellkultur**

Für die Zellkultur verwendete synoviale Fibroblasten wurden aus Synovialgeweben isoliert, welche im Rahmen von Kniegelenkersatz-Operationen entnommen wurden (s. Kapitel 3.1.1).

#### **3.6.1 Isolierung und Einfrieren humaner synovialer Fibroblasten**

Zur Gewinnung humaner synovialer Fibroblasten (RASf bei RA-Patienten und OASf bei OA-Patienten) wurden die 1 mm<sup>3</sup> großen Synovialgewebeproben nach Standardprotokollen der Arbeitsgruppe für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer 10-%igen Dispase-Lösung (Dispase II) auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Abbaureaktion durch Hinzufügen von 20 ml Fibroblastenmedium (Grundmedium DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), 10 % FCS, 1 U/ml P/S, 1 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)) abgestoppt. Daraufhin wurde die Zellsuspension mit Hilfe eines Siebes mit 70 µm weiten Poren von großen und unverdauten Gewebestücken getrennt und dann für zehn Minuten bei 300 xg zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellpellet in Fibroblastenmedium resuspendiert. Darauf folgte eine Kultivierung bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> in einer 25 oder 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche. Bei Erreichen der Passage zwei wurden die Zellen nach der Isolation in die Gewebekbank zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt und standen für diese Arbeit zur Verfügung. Dafür wurde die Hälfte des Zellpellets in etwa 1 ml Einfriermedium überführt und in einem Einfriergefäß (Kryovial) langsam mit Hilfe einer Kühlbox auf -80 °C abgekühlt. Am nächsten Tag wurden die Kryogefäße in den Stickstofftank überführt.

#### **3.6.2 Auftauen der synovialen Fibroblasten**

Für die Zellkultur-Versuche wurden RASf bzw. OASf in der zweiten Passage aufgetaut. Zum Auftauen der RASf wurde das Einfriergefäß langsam in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und in das vorgewärmte Voll-Medium überführt. Die Zellsuspension wurde daraufhin für zehn Minuten bei 300 xg zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das übrig gebliebene Pellet wurde dann in 12 ml Voll-Medium resuspendiert und für die weitere Kultur in eine T75-Flasche überführt. Ein Mediumwechsel erfolgte zwei Mal pro Woche. Das Einfrieren der nicht verwendeten Zellen in höheren Passagen wurde wie unter 2.2.6.1 beschrieben durchgeführt.

### 3.6.3 Kultur und Passagieren der synovialen Fibroblasten

Sobald die isolierten RASF bzw. OASF eine Konfluenz von etwa 90 % erreicht hatten, wurden sie mit PBS gewaschen. Um die adhärenen Zellen zu lösen, wurden die Zellen mit 1x Trypsin/EDTA inkubiert und anschließend die Reaktion mit Fibroblastenmedium gestoppt. Als nächstes folgte ein Zentrifugieren der Zellsuspension für zehn Minuten bei 300 xg. Das Zellpellet wurde nach Verwerfen des Überstands wieder in Fibroblastenmedium und eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Passage erhöhte sich dabei um eine Zahl. Ein Wechsel des Mediums wurde zwei Mal pro Woche durchgeführt.

### 3.6.4 Stimulierung der synovialen Fibroblasten

Bei einer Konfluenz von 90-100 % wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die Reaktion wurde mit Voll-Medium abgestoppt und das Volumen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach zehnminütigem Zentrifugieren bei 300 xg konnte der Überstand abgesaugt werden und das Zellpellet in Voll-Medium resuspendiert werden. Anschließend wurden die Zellen gezählt und etwa 100.000 in Voll-Medium auf ein Kulturplatte mit 6 Löchern (*six well*) verteilt. Zum Adhärenen wurden die Platten über Nacht im Brutschrank gelagert. Am nächsten Tag konnte das Medium abgesaugt und ein Medium mit der entsprechenden Stimulanz zugefügt werden. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Stimulierung wurde ein für die Zellüberstände der 17-stündig stimulierten RASF ein ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) für humanes IL-6 angewendet. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da synoviale Fibroblasten von RA-Patienten, welche im Sinne eines Entzündungsgeschehens aktiviert wurden, den Entzündungsmediator Interleukin 6 bilden, welcher bei der rheumatoiden Arthritis und ihrem Krankheitsverlauf von großer Bedeutung ist [4, 98]. Der Entzündungsreiz wurde für die Zellkultur-Versuche mit der Stimulierung durch die Entzündungsmediatoren IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  nachgestellt.

Die Zellkultur-Ansätze wurden mit fünf RASF- und fünf OASF-Populationen durchgeführt. Für jede Population wurden dabei Zellen durch unterschiedliche Substanzen stimuliert und verglichen. Dabei wurde entweder mit IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) oder dem TNF $\alpha$  (10 ng/ml) stimuliert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mitgeführt, bei denen eine Zugabe von DMEM ohne Zusatz erfolgte und welche somit nicht stimuliert wurden. Weiterhin wurden die Stimulierungen in ihrer Länge variiert, sodass mögliche zeitabhängige Regulierungen aufgedeckt werden konnten. Stimuliert wurde für 17 bzw. 3 Stunden. Nach der entsprechenden Stimulationszeit wurden die Überstände in 2 ml

Reaktionsgefäße überführt, bei 21.466 xg für zehn Minuten zentrifugiert und die erneut abgenommenen Überstände in 2 ml Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert. Für die Gewinnung der Lysate folgte zunächst ein Waschschrift mit PBS, welches anschließend abgegossen wurde. Pro Kulturplatte wurde daraufhin 350 µl Lysepuffer einer Lösung aus 396 µl RLT-Puffer und 4 µl β-Mercaptoethanol aufgetragen und die Zellen mit einem Zellschaber entfernt. Die erhaltenen Lösungen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße übertragen, zusammengeführt und bei -80 °C gelagert.

### **3.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Zur Quantifizierung von Zytokinen in Zellkulturüberständen wurde ein Festphasen-Sandwich-ELISA durchgeführt.

Das Prinzip des ELISA beruht dabei auf einer Messung der IL-6-Menge, die zwischen einem passenden Antikörper-Paar gebunden ist. In den Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden zielspezifische Antikörper vorbeschichtet. Die anschließend aufgetragenen Zellüberstände binden an den immobilisierten Antikörper. Durch die Zugabe des zweiten (Detektor-) Antikörpers wird daraufhin das Sandwich gebildet. Eine zugesetzte Substratlösung reagiert mit dem Enzym-Antikörper-Zielkomplex und erzeugt ein messbares Signal. Die Intensität dieses Signals ist dabei direkt proportional zur Konzentration des in der Originalprobe vorhandenen IL-6 [102, 103].

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben mit den bereitgestellten Lösungen. Dafür wurden zunächst 20 ml des Waschpuffer-Konzentrates mit 480 ml doppeldestilliertes Wasser versetzt und die IL-6-Standardlösung mit RD5T-Puffer auf eine Konzentration von 3,13 pg/ml verdünnt. Für die Substrat-Lösung wurden 100 µl ‚Color Reagent A‘ plus 100 µl ‚Color Reagent B‘ pro Kulturplatte aufgetragen. Die Proben wurden mit einer Verdünnung von 1:1000 oder 1:200 in ‚Calibrator Diluent RD5T‘ verwendet. Für die Durchführung des ELISA wurden 100 µl ‚AssayDiluent RD1W‘ mit 100 µl Standard (RD5T) oder der Probenverdünnung pro Kulturplatte aufgetragen, mit einer Klebefolie abgedeckt und nach kurzem, vorsichtigem Schütteln für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten ausgekippt und vier Mal mit dem Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurde die Lösung ausgekippt, trocken geklopft und je Kulturplatte 200 µl ‚Human IL-6 Conjugate‘ pipettiert. Es folgte nach dem Abdecken mit Klebefolie eine weitere Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde die Lösung abgekippt und erneut vier Mal mit Waschpuffer gewaschen sowie trocken geklopft. 200 µl Substrat-Lösung wurden auf jede Kulturplatte pipettiert und mit Klebefolie abgedeckt 20 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert.

Zum Beenden der Reaktion wurden anschließend je Kulturplatte 50 µl Stopplösung hinzugefügt und vorsichtig geschüttelt. Innerhalb von 30 Minuten erfolgte die Messung.

### **3.8 Reverse Transkriptase PCR**

Die Reverse Transkriptase (RT) PCR wurde durchgeführt, um die RNA zu amplifizieren. Das Prinzip einer PCR beruht auf der Amplifikation von Genabschnitten. Dabei wird ein Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation, 20- bis 50-mal durchlaufen. Die Reaktionen finden in einem Thermocycler statt. Während der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA auf 94 °C erhitzt, wodurch die Doppelstränge voneinander getrennt werden. Als nächstes folgt die Phase der Primerhybridisierung. In dieser Phase wird die Temperatur für 20 Sekunden auf einer für den Primer spezifischen Temperatur gehalten, bei der sich der gewünschte Primer an die DNA anlagern kann. Primer werden spezifisch für den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt gewählt, da sie die Grenzen dieses Abschnittes bilden und markieren. In der anschließenden Phase der Elongation findet die eigentliche Amplifikation statt. Bei 72 °C beginnt die DNA-Polymerase am 3'-Ende des angelagerten Primers den fehlenden Doppelstrang mit freien Nukleotiden aufzufüllen. Für diesen Vorgang wird die hitzestabile Taq-Polymerase eingesetzt. Da sich die DNA-Menge nach jedem Zyklus-Durchlauf verdoppelt, kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der cDNA-Sequenzen. Bei der RT-PCR wird die Amplifikation der RNA mittels einer reversen Transkription der RNA in die komplementäre DNA (cDNA) durch das Enzym reverse Transkriptase durchgeführt [104]. Die Teilschritte werden nachfolgend erläutert.

#### **3.8.1 RNA-Isolation**

Zur RNA-Isolation wurden die zuvor hergestellten Zelllysate mit Hilfe des RNeasy® mini Kits nach Herstellerprotokoll weiterverarbeitet. Hierzu wurden die Lysate mit 700 µl 70 %igem Ethanol auf eine Filterungssäule aufgetragen und bei 21.466 xg für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden 350 µl RW1 Waschpuffer hinzugefügt und bei 13.738 xg eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Für den DNase-Verdau wurden pro Säule 10 µl DNase I mit 70 µl RDD-Puffer gemischt aufgetragen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss folgte ein weiterer Waschschriff mit 350 µl RW1, Zentrifugieren bei 21.466 xg für 15 Sekunden und das Verwerfen des Durchflusses. Nach Auftragen von 500 µl RPE, Zentrifugieren und Verwerfen wurden die Proben nochmals für zwei Minuten zentrifugiert, um das restliche Ethanol zu entfernen. Die Säule wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß mit Deckel überführt und 50 µl

RNAse freies Wasser für eine Minute auf die Säule pipettiert. Nach einminütigem Zentrifugieren bei 21.466 xg konnte die Säule verworfen und die RNA-Isolate anschließend bei -80 °C gelagert werden. Für die Messung der RNA-Konzentration wurden die Proben mittels NanoDrop® Spectrophotometer gemessen und die Ratio bei 260/280 nm ermittelt.

### **3.8.2 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription**

In PCR-Röhrchen wurde 1 µl RNAsin sowie die benötigte und aus der RNA-Konzentration errechnete Menge der RNA-Lösung pipettiert und mit RNAse-freiem Wasser auf 32 µl aufgefüllt. Es folgte eine Hitzedenaturierung bei 70 °C für zwei Minuten mit anschließendem Kälteschock in Eiswasser. Daraufhin wurden 18 µl Mastermix hinzupipettiert. Dieser setzte sich zusammen aus 10 µl AMV-RT-Puffer, 5 µl PCR dNTP-Mix, 2 µl AMV Reverse Transkriptase und 1 µl Random Hexamer Primer. Daraufhin konnte die reverse Transkription gestartet werden. Die Zyklen beinhalteten 15 Minuten 25 °C, 5 Minuten 37 °C, 60 Minuten 42 °C, 30 Minuten 55 °C und 10 Minuten 72 °C. Eine anschließende Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **3.9 Real-Time semiquantitative PCR**

Um die Expression der Tetraspanine zu quantifizieren, wurde eine Real-Time-PCR mittels LightCycler® und einem SYBR Green Master Mix verwendet.

Die Real-Time-PCR bzw. (semi)quantitative PCR ist eine Variante der PCR, bei welcher eine kontinuierliche Beobachtung der Produktvermehrung während der gesamten PCR-Reaktion stattfindet. Aufgrund dieses Prinzips eignet sie sich besonders gut für die vergleichende Quantifizierung der PCR-Produkte. Der Probe wird der zunächst inaktive Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zugefügt. Dieser lagert sich bei der Elongation in die produzierte DNA ein und wird dadurch aktiviert. Mit zunehmender DNA-Menge verstärkt sich somit auch das Fluoreszenz-Signal. Nach jeder Elongationsphase der PCR wird die Intensität des SYBR-Fluoreszenz-Signals gemessen. Nach einer bestimmten Zeit erreicht das Signal einen Schwellenwert, den Schwellenwertzyklus ( $C_t$ -Wert, *cycle threshold*), welcher von der ursprünglichen Menge der Kopien abhängt. Um die Amplifikation semiquantitativ zu erfassen, wurden die Ergebnisse mit Hilfe des Referenzgens 18S rRNA normalisiert. Dafür geeignet ist es aufgrund seiner Eigenschaften als ribosomale RNA, welche ubiquitär und gleichmäßig in Zellen exprimiert wird [104].

### 3.9.1 Optimierung der Primer

Die Optimierung der Primer wurde vorab durch die Arbeitsgruppe, nicht durch die Promovendin selbst durchgeführt. Hierfür wurde zunächst mittels RNA-Isolation und Reverse Transkription die cDNA hergestellt. Zur Ermittlung des Temperaturoptimums für die Primerbindung wurden daraufhin verschiedene Primerbindungs-Temperaturen mithilfe einer PCR sowie anschließendem Auftragen auf ein Agarosegel getestet, bis sich eine Bande des entsprechenden Tetraspanins zeigte. Die Real-Time-PCR zum jeweiligen Tetraspanin wurde anschließend durch die Promovendin mit dem hierfür ermittelten Temperaturoptimum durchgeführt und jeweils eine Schmelzkurvenanalyse zum Nachweis der Bindungsspezifität ergänzt.

Durch die Schmelzkurven wird der Anteil der Einzelstränge im Verlauf der Temperaturerhöhung bei der Denaturierung dargestellt. Unterschiedliche Verläufe werden dabei durch die zunehmende Länge und dem Guanin-Cytosin-Gehalt des PCR-Produktes verursacht. Nach Transformierung der Schmelzkurven sollte nach einer spezifischen Amplifikation nur ein Peak dargestellt werden. Sind mehrere enthalten, ist von einer unspezifischen Reaktion auszugehen. Eine Quantifizierung wäre in diesem Fall fehlerbehaftet [105, 106].

### 3.9.2 Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der Real-Time-PCR wurden zunächst folgende Ansätze pipettiert: Für 18 µl Master-Mix mit 3 mM MgCl<sub>2</sub> wurden 10 µl SYBR Green Master-Mix, 1 µl Primer-vorwärts (10 µM), 1 µl Primer-rückwärts (10 µM) und 6 µl ddH<sub>2</sub>O RNase free vermischt. 18 µl Master-Mix mit 5 mM mgCl<sub>2</sub> enthielten 10 µl SYBR Green Master-Mix, 1 µl Primer-vorwärts (10 µM), 1 µl Primer-rückwärts (10 µM), 1,6 µl mgCl<sub>2</sub> (25 mM) und 4,4 µl ddH<sub>2</sub>O RNase free. Pro Kapillare wurden 18 µl des jeweiligen Master-Mix mit 2 µl cDNA-Template pipettiert. Für die Negativkontrolle wurden statt des cDNA-Templates 2 µl RNase-freies Wasser verwendet. Zur späteren Normalisierung der Ergebnisse wurde das Referenzgen 18S rRNA mitgeführt.

### 3.9.3 Durchführung

Das Programm der Real-Time-PCR wurde je nach Primer modifiziert. Die Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 15 Minuten. Für die Amplifikation wurden 45 Zyklen aus Denaturierung (94 °C für 15 Sekunden), Primerhybridisierung (Annealing, bei der für den Primer entsprechenden Temperatur (s.Tab. 16) für 20 Sekunden) und Elongation (Extension, bei 72 °C für 20 Sekunden) durchlaufen. Die zugehörige Software des LightCyclers führte während der PCR-Reaktion die Quantifizierung der Proben durch.

## 3.10 Auswertungen

### 3.10.1 Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbungen

#### 3.10.1.1 Auswahl der Synovialgewebe

Für die Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbungen von CD63, CD81 und CD151 wurden Gewebeproben von 15 RA-Patienten und 15 OA-Patienten, welche möglichst sowohl *lining layer* als auch *sublining* und Gefäße enthielten, verwendet.

Die Gewebeproben wurden mittels Hämatoxylin-/Eosin-Färbung auf ihre Struktur und Eignung überprüft und ausgewählt. Alle 30 Gewebeproben wurden für jedes einzelne Tetraspanin mit den etablierten Protokollen in einem gemeinsamen Durchlauf gefärbt und mit den gleichen Mikroskop-Einstellungen fotografisch festgehalten, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen. Zur Kontrolle wurde je Durchlauf eine Isotypkontrolle mitgeführt.

#### 3.10.1.2 Auswertung des Synovialgewebes

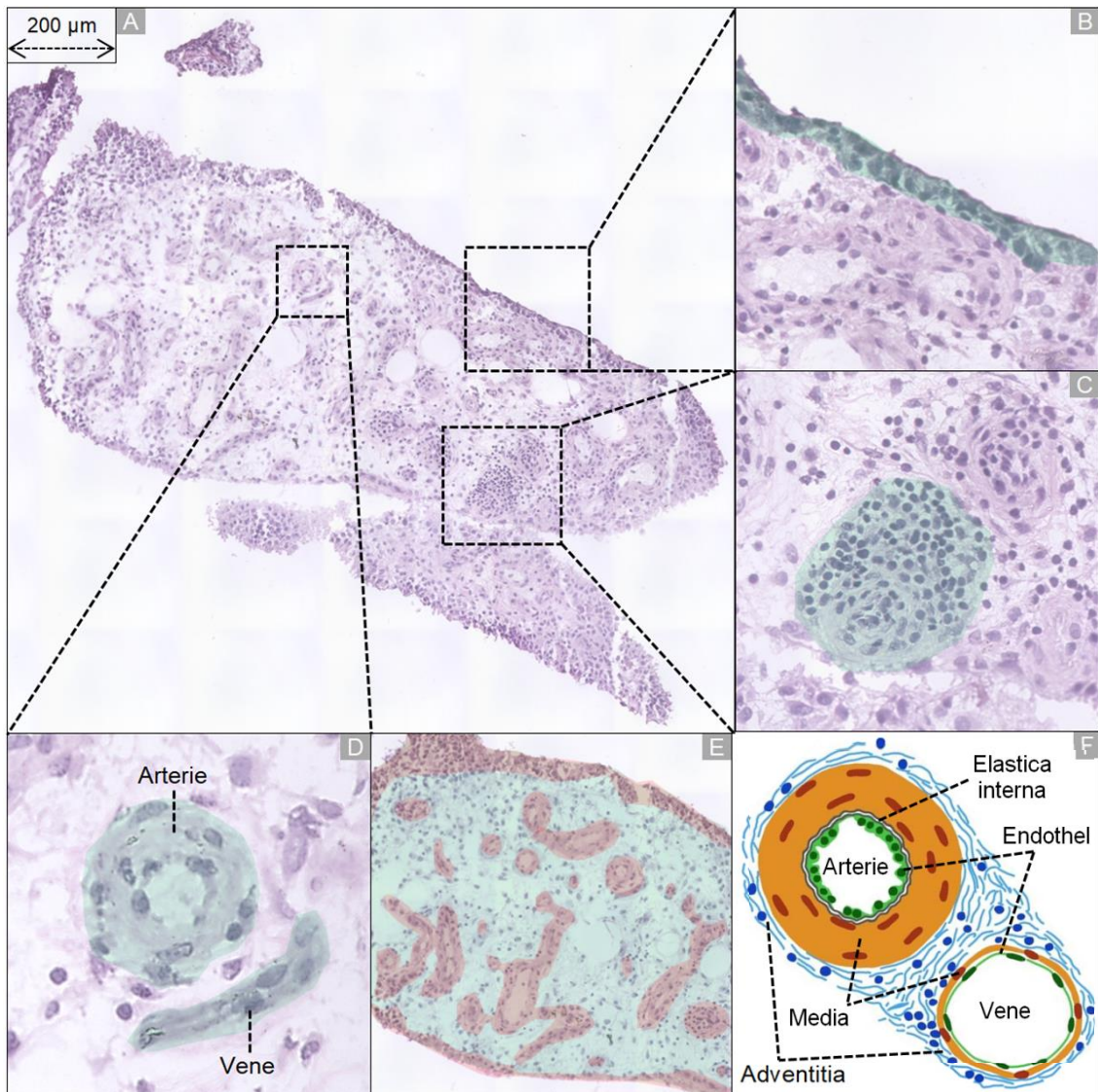
Es wurde festgestellt, dass die unterschiedliche Darstellung der Bilder auf verschiedenen Monitoren und die Helligkeit des Raumes einen großen Einfluss für die Auswertung der Bilder spielte. Daher wurden die Bilder immer an demselben Computerbildschirm bewertet. Dieser befand sich in einem abgedunkelten Raum, damit keine Signale verloren gingen. Als Darstellungsprogramm wurde das Programm Microsoft Fotos 2020 (Microsoft Corporation) mit dunklem Hintergrund gewählt.

Um die verschiedenen Gewebeproben vergleichen zu können, wurde das Gewebe in spezifische Regionen unterteilt und es wurden Auswertekriterien definiert. Als Regionen von besonderem Interesse wurden *lining layer*, *sublining* (unter Ausschluss von zellulären Infiltraten und Gefäßen), Infiltrate und Gefäße ausgewählt (s. Abb. 5).

Betrachtet man kleinere Gefäße genauer, lässt sich ihr Wandaufbau in die drei Schichten Intima, Media und Adventitia gliedern (s. Abb. 5F). Die innen liegende Intima wird aus einer Endothelzellschicht mit darunterliegender, dünner Bindegewebsschicht und *Elastica interna* gebildet. Daran anschließend findet sich die Media, eine Schicht aus glatter Muskulatur sowie kollagenen und elastischen Fasern. Außen liegend zeigt sich die Schicht der Adventitia. Sie besteht aus Bindegewebe mit elastischen und kollagenen Fasern. Bei Venen können auch längs verlaufende, glatte Muskelzellen vorkommen. Arterien und Venen lassen sich nicht nur in ihrer Funktion unterscheiden, sondern weisen auch unterschiedliche Charakteristika auf. So lässt sich bei Arterien meist sowohl die Dreischichtung der Gefäßwand als auch die *Elastica interna* erkennen. Bei Venen

sind die Wandschichten dagegen meist schwer abgrenzbar und die *Elastica interna* nicht erkennbar. Die *Media* ist weniger prominent und lockerer aufgebaut. Während bei Arterien meist ein rundes Lumen zu beobachten ist, zeigen Venen oft ein eher länglich-ovales oder auch kollabiertes Lumen [5].

Die in der Endstrombahn vorliegenden Kapillaren weisen dagegen nicht den typischen, dreischichtigen Wandaufbau auf. Sie werden durch Endothel, Basallamina und Perizyten gebildet [5].



**Abb. 5: Darstellung der definierten Synoviumareale anhand eines Beispiels**

Dargestellt ist die Hämalaun-Eosin-Färbung eines beispielhaften Synoviums (A) zur Demonstration der untersuchten und zur Auswertung herangezogenen Areale: *Lining layer* (B, grün markiert), Infiltrate (C, grün markiert), Gefäße (D, grün markiert) und *sublining* (E, grün markiert, rote markierte Bereiche wurden in diese Kategorie nicht mit einbezogen). Abb. 5F zeigt den schematischen Aufbau von Arterie und Vene.

Zur Auswertung der verschiedenen Regionen wurde jeweils ein Score der definierten Merkmale entwickelt. Mithilfe dieses Scores wurde jedes Tetraspanin bezüglich jeder definierten Region ausgewertet. Danach folgte eine statistische Analyse der Ergebnisse. Ein weiterer Score wurde für die Beurteilung der Farbintensität von Zellen im *sublining* entwickelt. Die Bewertung der Intensität erfolgte durch die Promovendin. Um das Ausmaß der Subjektivität zu überprüfen, bewerteten zudem zwei weitere Personen die Farbintensität mit Hilfe des entwickelten Scores unabhängig. Dazu wurde eine möglichst genaue Score-Beschreibung verfasst, welche den beiden Scorer zu Verfügung gestellt wurde. Jeder der beiden Scorer sowie die Promovendin bewerteten die Bilder jeweils immer an demselben Computerbildschirm. Untersucht wurde dabei die Färbung des Tetraspanins CD63. Die Ergebnisse der drei unterschiedlichen Scorer wurden anschließend verglichen und ausgewertet.

Von weiterem Interesse war die Möglichkeit, dass die bei den Immunfluoreszenz-Färbungen ermittelten Ergebnisse von Eigenschaften der individuellen Gewebeprobe beeinflusst sein könnten. Zur Untersuchung dieses Phänomens wurden verschiedene Daten zu Gewebeprobe und Patient gesammelt. Zur Auswertung der Daten wurde ein dritter Score entwickelt und dessen Ergebnisse ausgewertet.

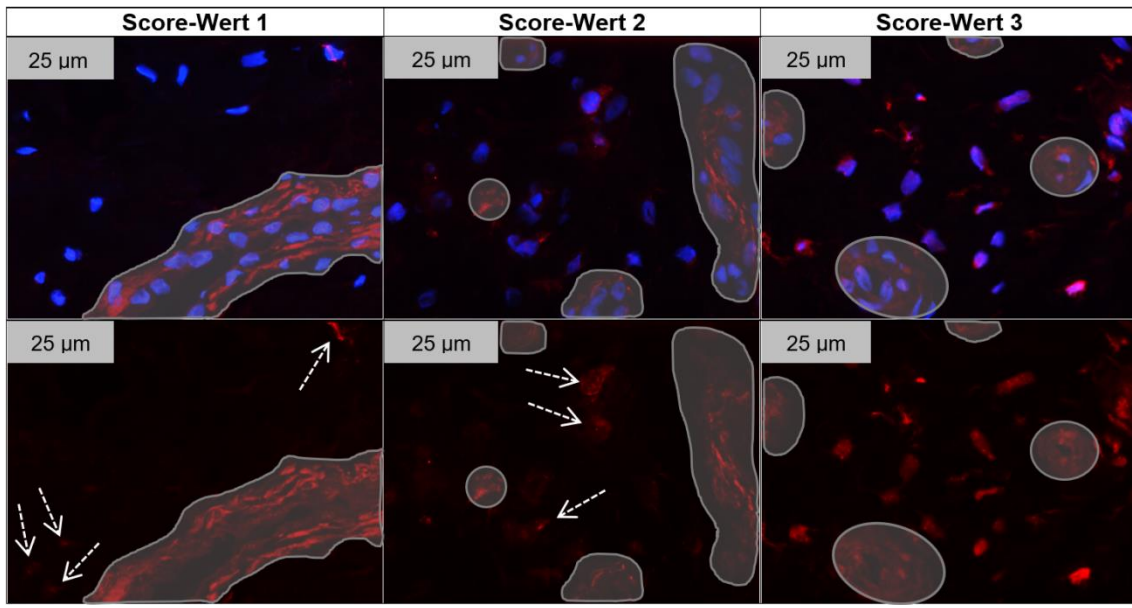
Für die Auswertung der Doppel-IF-Färbungen wurden die bereits für die Immunfluoreszenz untersuchten Regionen nochmals im Hinblick auf die Lokalisation zweier Tetraspanine zueinander untersucht. Genauer betrachtet wurden *lining layer*, *sublining* und Gefäße. Ein vierter Score wurde hierfür entwickelt, angewendet und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

### 3.10.1.3 Score-Definition zur Auswertung der Immunfluoreszenz

Für die Auswertung der Gewebeschnitte wurden die Regionen des *lining layer*, dem *sublining* und der Gefäße genauer untersucht. Um die Färbung zu beurteilen, wurde ein Score für den Anteil positiver und damit gefärbter Zellen entwickelt und dieser in den verschiedenen Grund- und Spezialkategorien angewendet (vgl. Tab. 28 und Abb. 6).

**Tab. 28: Score Immunfluoreszenz-Signal Tetraspanine**

| Beschreibung   | Score-Wert |
|--|------------|
| Kategorie/ Areal nicht vorhanden   | -          |
| keine Färbung/<br>nichtzutreffend  | 0          |
| wenige Bereiche oder einzelne Zellen gefärbt/<br>bei einzelnen Gefäßen zutreffend                                      | 1          |
| mittelstarke Färbung, die mindestens die Hälfte der Probe betrifft/<br>für mindestens die Hälfte der Gefäße zutreffend | 2          |
| der Großteil der Probe ist mittel bis stark gefärbt/<br>für den Großteil der Gefäße zutreffend                         | 3          |



**Abb. 6: Beispiel der Zuteilung von Score-Werten anhand des Areals *sublining***

Dargestellt ist die Zuordnung der Score-Werte im Fall einer vorhandenen Tetraspanin-Färbung für das Areal *sublining*. Zur Beurteilung und Score-Vergabe wird stets das gesamte Gewebe einbezogen. Zur besseren Veranschaulichung werden hier nur Gewebeausschnitte gezeigt. In der ersten Bildzeile wird das Antikörper-Signal des Tetraspanins (rot) mit zusätzlich angefärbten Zellkernen (blau) gezeigt. Die zweite Bildzeile enthält das entsprechende Bild ohne die zusätzliche Kernfärbung. In dem Areal *sublining* werden Zellen, welche Gefäße bilden, oder Zellen, welche keine eindeutige Kernfärbung aufweisen, nicht beurteilt (grau markierte Bereiche). Die dem *sublining* zugeordneten Zellen werden auf ihr, dem Tetraspanin entsprechenden Antikörper-Signal überprüft und einem Score-Wert zugeteilt. Ein Score von eins wird vergeben, wenn nur wenige Bereiche innerhalb des Gewebes oder einzelne Zellen gefärbt sind (s. Pfeile). Wenn eine mittelstarke Färbung mindestens die Hälfte der Probe betrifft, entspricht dies einem Score von zwei (Pfeile markieren stärker gefärbte Zellen). Ist der Großteil des entsprechenden Areals in der Probe mittel bis stark gefärbt, erhält das Gewebe in dieser Kategorie einen Score von drei (alle Zellen weisen eine starke Färbung auf).

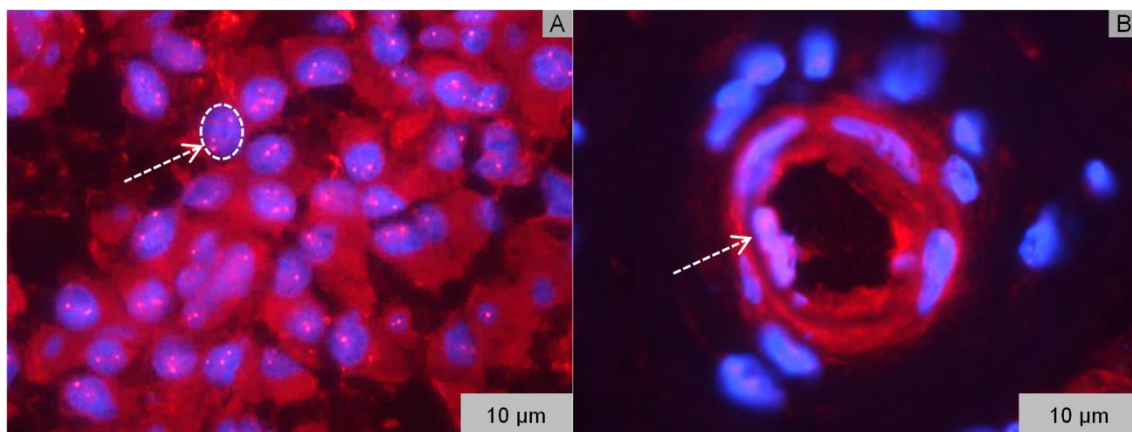
Es wurden verschiedene Haupt- und Unterkategorien festgelegt (Zusammenfassung s. Tab. 29). Als Hauptkategorien für alle drei Tetraspanine CD63, CD81 und CD151 wurden die Areale *lining layer*, Gefäße und *sublining* untersucht (s. Abb. 5). Dabei wurde bei den Gefäßen die Endothelzellschicht von den peripheren Schichten Media und Adventitia (vgl. Abb. 5F) unterschieden. Außerdem wurde auf einen möglichen Unterschied zwischen arteriellem und venösem Gefäß geachtet. Diese Kategorie wurde nicht mittels Score, sondern mit ja oder nein bewertet. Im *sublining* wurden vorhandene Infiltrate von anderen im *sublining* vorkommenden Zellen unabhängig betrachtet. Eine weitere Spezifizierung der Zellen im *sublining* wurde nicht vorgenommen.

Für die einzelnen Tetraspanine wurden weitere Kategorien festgelegt. Für diese Kategorien wurden nur Ausschnitte der Gewebe mit 400-facher Vergrößerung verwendet, da in geringerer Vergrößerung keine Beurteilung möglich war.

**Tab. 29: Kategorien zur Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbungen**

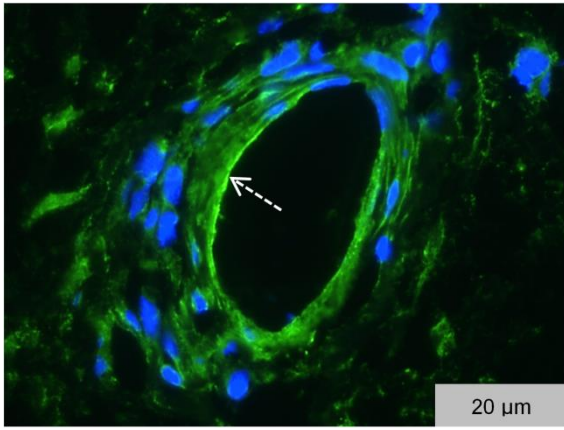
| Hauptkategorie   | Unterkategorien   |  |
|--|---|--|
| <b>Grundkategorien für alle Tetraspanine</b>                       |   |  |
| <i>Lining layer</i>  |   |  |
| Gefäße   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Endothelzellen</li> <li>• Media/Adventitia</li> </ul>                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unterschied arteriell/venös</li> </ul>            |
| <i>Sublining</i>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellen</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Infiltrate</li> </ul>                             |
| <b>Zusätzliche Spezialkategorien für CD63</b>                      |   |  |
| Färbemuster im Kernbereich   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lining layer</i></li> <li>• Endothel</li> <li>• Media/Adventitia</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Sublining</i></li> <li>• Infiltrate</li> </ul> |
| Aussparung innerhalb der Gefäßwand                                 |   |  |
| <b>Zusätzliche Spezialkategorien für CD81</b>                      |   |  |
| verstärkte Färbung des Endothels im Vergleich zur Media/Adventitia | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Arterie</li> <li>• Vene</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Färbung ohne Zuordnung</li> </ul>                 |
| <b>Zusätzliche Spezialkategorien für CD151</b>                     |   |  |
| spezielles Färbemuster im Kernbereich                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lining layer</i></li> <li>• Endothel</li> <li>• Media/Adventitia</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Sublining</i></li> <li>• Infiltrate</li> </ul> |
| starke Färbung Fibroblasten (FB)-ähnlicher Zellausläufer           |   |  |
| Endothel (und Adventitia) stärker gefärbt als Media                |   |  |

Für CD63 wurde außerdem ein spezielles Färbemuster im Kernbereich von Zellen (s. Abb. 7A) untersucht, welches im Rahmen der IF-Auswertung auffiel. Dieses Färbemuster wurde in Zellen von *lining layer*, Endothel, Media/Adventitia, *sublining* und Infiltraten überprüft. Ebenso fiel eine Aussparung der Färbung innerhalb der Schichten der Gefäßwand auf (s. Abb. 7B). Auch hinsichtlich dieses Merkmals wurden Gefäße untersucht.



**Abb. 7: Beispiel des Färbemusters im Kernbereich sowie der Aussparung der CD63-Färbung innerhalb der Gefäßwand (Spezialkategorien der Immunfluoreszenz-Auswertung)**  
Gezeigt sind Merkmale, welche bei der Auswertung der CD63-Immunfluoreszenz-Färbungen zusätzlich zu den Grundkategorien ausgewertet wurden. Zum einen konnten isolierte Signale des CD63-Antikörpers (rot) im Kernbereich (blau) von Zellen beobachtet werden (A, beispielhaft markiert). Zum anderen zeigte sich eine Aussparung der Färbung innerhalb der Gefäßwandschichten (B, mit Pfeil markiert).

Bei der Auswertung der IF-Färbungen zum Tetraspanin CD81 zeigte sich vereinzelt eine verstärkte Färbung des Endothels im Vergleich zur Media bzw. Adventitia (s. Abb. 8). Dieses Merkmal wurde als Spezialkategorie für CD81 untersucht. Dabei wurden Arterien und Venen unterschieden. Konnte das Gefäß nicht eindeutig als Arterie oder Vene identifiziert werden, so wurde es in der Kategorie *Färbung ohne Zuordnung* ausgewertet.



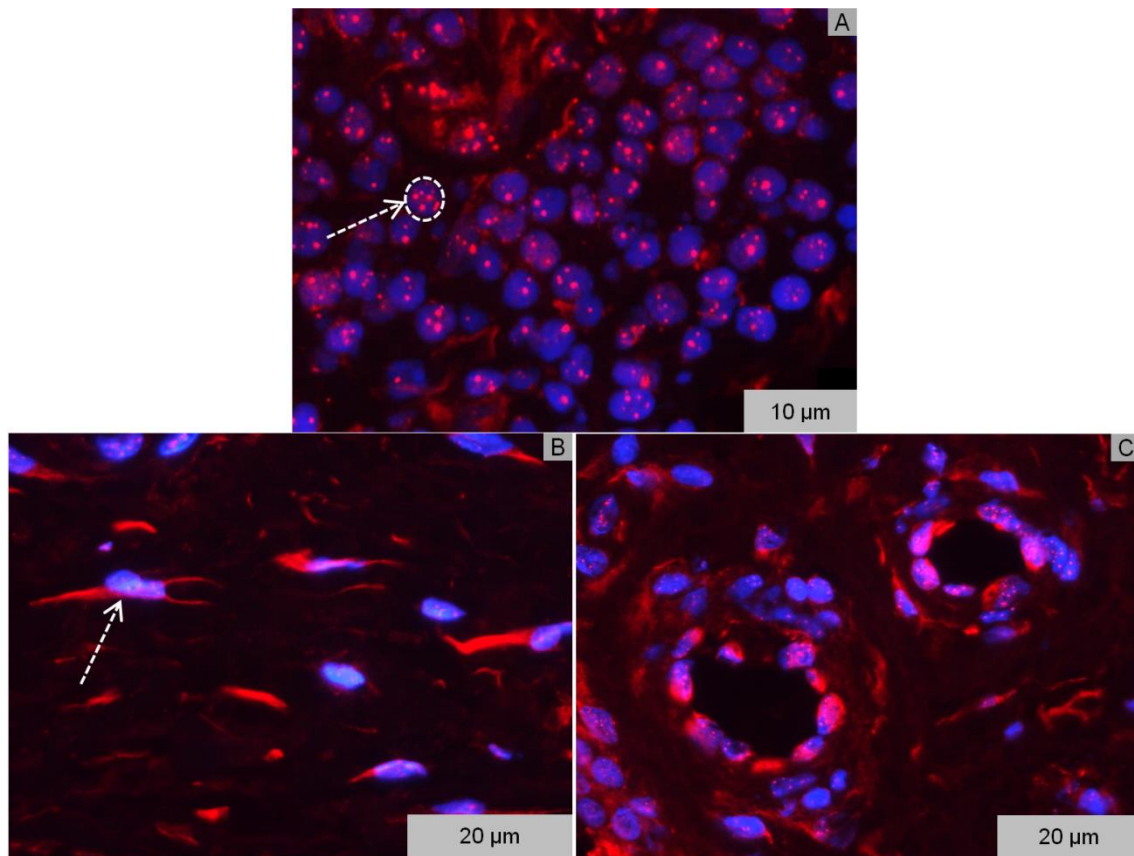
**Abb. 8: Beispiel der stärkeren CD81-Färbung des Endothels im Vergleich zur Media bzw. Adventitia (Spezialkategorie der Immunfluoreszenz-Auswertung)**

Gezeigt ist eine stärkere Färbung des Endothels (mit Pfeil markiert) im Vergleich zur Media bzw. Adventitia. Dieses Merkmal wurde bei der Auswertung der CD81-Immunfluoreszenz-Färbungen zusätzlich zu den Grundkategorien ausgewertet. Signale des CD81-Antikörpers fluoreszieren grün, Zellkerne sind blau fluoreszierend.

Im Rahmen der IF-Auswertung des Tetraspanins CD151 konnte ebenfalls ein spezielles Färbemuster im Kernbereich von Zellen beobachtet werden (s. Abb. 9A). Hinsichtlich dieses Färbemusters wurden Zellen in *lining layer*, Endothel, Media/Adventitia, *sublining* und Infiltraten untersucht. Außerdem fielen einerseits eine starke Färbung der zytoplasmatischen Bereiche von Zellen auf, deren spitz und lang gezogenen Ausläufer der typischen Struktur von Fibroblasten (FB) ähnelten (s. Abb. 9B). Der in dieser Arbeit als zytoplasmatischer Bereich bzw. Zytoplasma bezeichnete Bereich definiert ein Areal, welches sich außerhalb des Zellkerns befindet und dem Zytoplasma der Zelle entsprechen könnte. Aufgrund der Zweidimensionalität der Bilddokumentation der verwendeten histologischen Methode ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass ein Signal dieses Bereiches durch die Zellmembran des Zellausläufers im Gewebeschnitt gebildet wird.

Andererseits zeigte sich vereinzelt eine verstärkte Färbung von Endothel (eventuell auch der Adventitia) im Vergleich zur Media (s. Abb. 9C). Auch bezüglich dieser beiden Kriterien wurden die IF-Färbungen ausgewertet.

Die aus der Auswertung der drei Tetraspanine entstandenen Datensätze der Score-Ergebnisse wurden anschließend statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.



**Abb. 9: Beispiel des Färbemusters im Kernbereich, der starken CD151-Färbung in Zellausläufern sowie der stärkeren CD151-Färbung des Endothels im Vergleich zur Media (Spezialkategorien der Immunfluoreszenz-Auswertung)**

Gezeigt sind Merkmale, welche bei der Auswertung der CD151-Immunfluoreszenz-Färbungen zusätzlich zu den Grundkategorien ausgewertet wurden. Einerseits konnten isolierte Signale des CD151-Antikörpers (rot) im Kernbereich (blau) von Zellen beobachtet werden (A, beispielhaft markiert). Andererseits zeigte sich eine starke Färbung in den Ausläufern von Zellen mit Fibroblasten-ähnlichem Aussehen (B, mit Pfeil beispielhaft markiert). Außerdem fiel vereinzelt eine verstärkte Färbung von Endothel (eventuell auch der Adventitia) im Vergleich zur Media auf (C, Beispiel zweier Gefäße).

#### 3.10.1.4 Score-Definition zur Auswertung der Doppel-Immunfluoreszenz

Zur Auswertung der Doppel-IF wurden alle dokumentierten Bilder der 400-fachen Vergrößerung herangezogen. Aufgrund der zuvor beobachteten Expressionscharakteristika der Tetraspanine CD81 und CD151 wurden im Bereich des *lining layers*, im Endothel sowie in Media/Adventitia von Gefäßen als auch im *sublining* jeweils die Zellareale Zellkern und Zytoplasma bezüglich ihrer Färbung beurteilt. Der dabei als zytoplasmatischer Bereich bzw. als Zytoplasma bezeichnete Bereich definiert ein Areal, welches sich außerhalb des Zellkerns befindet und dem Zellkörper der Zelle entsprechen könnte. Aufgrund der Zweidimensionalität der Bilddokumentation der verwendeten histologischen Methode ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass ein Signal dieses Bereiches durch die Zellmembran gebildet wird und in der Aufsicht nicht unterschieden

werden kann. Bei Fibroblasten-ähnlichen Zellen wurden zudem die Zellausläufer untersucht (Zusammenfassung s. Tab. 30).

**Tab. 30: Haupt- und Unterkategorien zur Auswertung der Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen**

| Hauptkategorie      |                  | Unterkategorien             |                                       |
|---------------------|------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| <i>Lining layer</i> |                  | • Zellkerne                 | • Zytoplasma                          |
| Gefäße              | Endothelzellen   | • Zellkerne                 | • Zytoplasma                          |
|                     | Media/Adventitia | • Zellkerne                 | • Zytoplasma                          |
| <i>Sublining</i>    |                  | • Zellkerne<br>• Zytoplasma | • Fibroblasten-ähnliche Zellausläufer |

Um die Lokalisation der Tetraspanine zueinander beschreiben und statistisch auswerten zu können, wurde ein Score (s. Tab. 31) entwickelt. Wurde in einer Kategorie hauptsächlich das Tetraspanin CD81 exprimiert (grünes Signal), so wurde ihr der Score eins zugeordnet. Wenn sowohl CD81 und CD151 in gleichem Ausmaß exprimiert wurden (oranges oder gelb-grünes Signal), erhielt diese Kategorie den Score zwei. Ein Score von drei wurde bei einer hauptsächlich Expression des Tetraspanins CD151 (rotes Signal) vergeben. Weiterhin wurde der Score null für den Fall definiert, dass keine der drei Färbungen vorhanden war. War die Kategorie bzw. das entsprechende Areal in der jeweiligen Gewebeprobe nicht vorhanden, wurden diese Proben in diesen Kategorien von der Auswertung ausgeschlossen.

Die Score-Ergebnisse wurden anschließend graphisch ausgewertet und dargestellt.

**Tab. 31: Score Doppel-Immunfluoreszenz**

| Tetraspanin-Expression                       | Fluoreszenz-Signalfarbe | Score-Wert |
|--|-------------------------|------------|
| Kategorie/ Areal nicht vorhanden             | -                       | -          |
| keine Färbung vorhanden                      | -                       | 0          |
| hauptsächlich CD81 exprimiert                | grün                    | 1          |
| CD81 und CD151 in gleichem Ausmaß exprimiert | orange/gelb-grün        | 2          |
| hauptsächlich CD151 exprimiert               | rot                     | 3          |

### 3.10.1.5 Score-Definition zur Beurteilung der Farbintensität von Zellen im sublining

Für die Auswertung der Farbintensität wurde jeweils ein 400x-Ausschnitt pro Gewebe ausgewählt, auf dem ein repräsentatives *sublining* erkennbar war. Nicht in die Beurteilung einbezogen wurden dabei Zellen, welche Gefäße oder *lining layer* bildeten oder welche in der direkten Nähe dieser Strukturen lagen (s. Abb. 5E). Alle anderen Zellen wurden dem *sublining* zugeordnet

Zu Beginn wurden alle Zellen des *sublinings* gezählt, welche in der DAPI-Belichtung eine

deutliche Kernfärbung zeigten. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass Signale, einzelnen Zellen zuzuordnen waren und dass es zu keiner Verfälschung der Ergebnisse durch die starken Signale der Gefäße und des *lining layer* kam. Jede gezählte Zelle wurde mit einem Punkt markiert, um eine Dopplung zu vermeiden.

Begutachtet wurde die Farbintensität stets in der Y3-Belichtung. Um die zu bewertenden Zellen erkennbar zu machen, wurde die Y3-Belichtung immer im Vergleich zum Overlay mit der DAPI-Färbung beurteilt.

Es wurden drei Kategorien festgelegt. Zeigten die Zellen kein erkennbares farbiges Signal, wurden sie der Kategorie *negativ* zugeordnet. Als weitere Kategorien wurden die Intensitäten in schwach und stark positiv eingeteilt. Zellen waren stark positiv, wenn sie einerseits eine den Gefäßzellen ähnlich starke Färbung oder andererseits das für das jeweilige Tetraspanin charakteristische Färbungsmuster im Zellkernbereich aufwiesen. Da die Farbintensität in verschiedenen Bereichen der Zelle variiert, wurde immer die stärkste Intensität der Zelle, unabhängig von der Größe dieses Bereiches, beurteilt. Alle anderen Zellen, welche weder den Kategorien *negativ* oder *stark positiv* zuzuordnen waren, wurden der Kategorie *schwach positiv* zugeteilt. Aus den ausgezählten Zellen wurde pro Kategorie der Anteil an der Gesamtzellzahl errechnet.

Um das Ausmaß der Subjektivität zu überprüfen, bewerteten zwei weitere Personen unabhängig voneinander die Farbintensität mittels des entwickelten Scores. Dazu diente eine genaue Score-Beschreibung, welche den beiden Scornern zu Verfügung gestellt wurde. Untersucht wurde dabei die Färbung des Tetraspanins CD63. Die Ergebnisse der drei unterschiedlichen Scorer wurden anschließend verglichen und ausgewertet. Die Auswertung der Tetraspanine CD81 und CD151 erfolgte anschließend durch die Beurteilung der Promovendin. Die gesammelten Daten wurden statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

### **3.10.1.6 Klinische Daten der Gewebe**

Zu den ausgewählten anonymisierten Patientenproben wurden verschiedene Merkmale und Daten notiert. So wurden Entnahmedatum, Geschlecht, Alter des Patienten bei Entnahme, Diagnose, körperlicher Befund, Röntgenbefund, Nebendiagnosen, bisherige Therapie und Medikamente erfasst. Für die RA-Patienten wurde außerdem der Zeitraum zwischen Erstdiagnose und Entnahmedatum berechnet und dokumentiert. Eine weitere Kategorie, welche den Entzündungsgrad beinhaltete, wurde aus den Angaben zum körperlichen Befund des Patienten vor Entnahme des Kniegelenks erstellt. Hierfür wurde ein neuer Score entwickelt. Gewebeproben, bei denen keine Angabe zum Entzündungsgrad übermittelt wurde, wurden aus der Wertung herausgenommen. Lag

keine Entzündung vor, erhielten diese Gewebe einen Score von null. Wurde in den Angaben von einer leichten Entzündung des Kniegelenks berichtet, ergab dies einen Score von eins. Ein Score von zwei wurde für die Beschreibung einer starken Entzündung vergeben (Tab. 32).

**Tab. 32: Score Entzündungsgrad**

| Beschreibung            |        | Score-Wert |
|-------------------------|--------|------------|
| Angabe nicht vorliegend |        | -          |
| keine Entzündung        |        | 0          |
| Entzündung              | leicht | 1          |
|                         | stark  | 2          |

Bezüglich der Angaben zur Medikamentenanamnese wurden alle entzündungshemmenden Präparate summiert und die Anzahl in einer weiteren Kategorie festgehalten.

Die Ergebnisse aus dieser Datenerhebung wurden anschließend auf mögliche Korrelationen mit den Ergebnissen aus den Immunfluoreszenz-Färbungen der Tetraspanine untersucht.

### 3.10.2 Auswertung der Stimulationsversuche

#### 3.10.2.1 Auswertung der proentzündlichen Reaktion der RASF

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Stimulierung wurden die Überstände der für 17 Stunden stimulierten RASF einer ELISA-Messung zur Quantifizierung von IL-6 zugeführt. Der generierte Datensatz wurde mittels des Statistik-Programms GraphPad Prism ausgewertet. Die IL-6-Konzentration für jede RASF-Population wurde mittels Säulendiagramm veranschaulicht. Dabei wurden die mit proentzündlichen Faktoren IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) oder TNF $\alpha$  (10 ng/ml) stimulierten RASF der Kontrolle mit unstimulierten RASF gegenübergestellt. Außerdem wurden die arithmetischen Mittelwerte aus den IL-6-Konzentrationen der RASF-Populationen und die dazugehörigen Standardabweichungen für jede Gruppe berechnet und ebenfalls mittels Säulendiagramm dargestellt. Verglichen wurden die IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  stimulierten RASF mit der unstimulierten Kontrollkultur.

#### 3.10.2.2 Auswertung Tetraspaninexpressionsprofil

Die mittels Real-Time-PCR generierten Daten wurden zunächst hinsichtlich eines erfolgreichen Durchlaufs beurteilt. Dafür wurde über eine Analyse von Wasserkontrolle und Schmelzkurven die Spezifität der PCR-Produkte geprüft. Waren die Wasserkontrollen nicht negativ und zeigten sich Wellen in den Schmelzkurven, wurden die PCRs mit neuen Primern und neuem Wasser wiederholt. Lieferte die PCR weiterhin

keine spezifischen Ergebnisse, wurde sie nochmals mit einer anderen Primerbindungs-Temperatur wiederholt. Bei korrektem Durchlauf der Real-Time-PCR wurden die Ergebnisse graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet (s. Kapitel 3.11.2).

## **3.11 Statistik**

### **3.11.1 Statistik der Immunfluoreszenz-Färbungen**

#### **3.11.1.1 Graphische Darstellung und statistische Auswertung**

Für die graphische Darstellung und die statistische Auswertung von Ergebnissen aus den IF-Färbungen der Tetraspanine CD63, CD81 und CD151 wurde das Statistik-Programm GraphPad Prism (Version 6 und 8) verwendet.

Für die graphische Auswertung der IF-Färbungen wurden die entsprechenden Datensätze in das Programm überführt. Innerhalb der unterschiedlichen Kategorien wurden die Ergebnisse der RA-Gewebeproben denen der OA-Gewebeproben gegenübergestellt. Pro Kategorie wurde der arithmetische Mittelwert der Score-Werte errechnet und mit der entsprechenden Standardabweichung als Säulendiagramm dargestellt.

Zur Auswertung der Farbintensität wurden für das Tetraspanin CD63 zunächst die verschiedenen Ergebnisse der drei Scorer gegenübergestellt und verglichen. Dafür wurden die arithmetischen Mittelwerte aus den drei Scorer-Ergebnissen für jede einzelne Gewebeprobe und Kategorie mit Microsoft Excel berechnet. Graphisch wurden anschließend die Mittelwerte der Anteile von stark bzw. schwach positiven Zellen an der Gesamtzellzahl inklusive der entsprechenden Standardabweichung dargestellt. Die Gruppe der RA-Gewebe wurde den OA-Geweben gegenübergestellt. Für die Auswertung der Tetraspanine CD81 und CD151 erfolgte auf der Grundlage von Ergebnissen eines Scorers. Die graphische Darstellung wurde entsprechend der des Tetraspanins CD63 durchgeführt.

Für die Auswertung der Doppel-IF wurde eine graphische Darstellung mittels Microsoft Excel gewählt. Hierzu wurde die Menge der dem jeweiligen Score-Wert zugeordneten Gewebe für die Gruppen OA und RA summiert, tabellarisch dargestellt und als Säulendiagramm in Form von Anteilen an der Stichprobenanzahl dargestellt.

Bei der statistischen Auswertung der Datensätze wurden nicht-parametrische und zweiseitige Statistikanalysen verwendet, da nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden konnte. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf 5 % sowie die Variablen als unabhängig festgelegt. Signifikanzen wurden als  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*)

und  $p < 0,001$  (\*\*\*) definiert und als solches im Graphen markiert.

Für die Auswertung der einzelnen Tetraspanine wurden im Rahmen der Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen der OA- und RA-Gruppe alle einzelnen Kategorien untereinander mittels des Šídák-Tests, einem paarweisen multiplen Vergleichstest im Rahmen einer 2way ANOVA Analyse, unterzogen. Jede Kategorie wurde anschließend nochmals einzeln mittels Mann Whitney Test einzeln überprüft.

Im Rahmen der Farbintensitäts-Auswertung wurde ein paarweiser multipler Vergleichstest im Rahmen eines 2way ANOVA Šídák-Tests durchgeführt. Dabei wurden die arithmetischen Mittelwerte der Gruppen „stark positiv“ und „schwach positiv“ innerhalb der OA- bzw. RA-Gruppe bezüglich eines signifikanten Unterschieds getestet. Weiterhin wurde ein multipler Vergleichstest durchgeführt, welcher die arithmetischen Mittelwerte aller Gruppen miteinander auf signifikante Unterschiede testete. Durchgeführt wurde ein 2way ANOVA Tukey-Test, um die Wahrscheinlichkeit auf einen Fehler erster Art (falsch positiv) bei den Signifikanz-Tests zu reduzieren.

### **3.11.1.2 Korrelationsanalysen**

Zur Untersuchung der klinischen Daten der Patienten, deren Gewebe im Rahmen der IF-Färbungen zu jedem einzelnen Tetraspanin ausgewertet wurden, auf möglicherweise bestehende Korrelationen zu den Ergebnissen in den Beurteilungskategorien der Immunfluoreszenz-Färbungen, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Ebenfalls wurden die Ergebnisse der verschiedenen Tetraspanine auf mögliche Korrelationen zu einander geprüft. Die entsprechenden Datensätze wurden in GraphPad Prism eingefügt. Die Gruppen der OA- und RA-Gewebe wurden für diese Analyse zusammengeführt. Es wurde aus den Score-Daten der IF-Auswertungen sowohl für jedes Tetraspanin einzeln, als auch für den Vergleich zweier Tetraspanine miteinander, eine Korrelationsmatrix erstellt, in welcher alle Kategorien miteinander mittels Korrelationstestung nach Spearman untersucht wurden. Zum Vergleich zweier Tetraspanine wurde ein arithmetischer Mittelwert aus den OA-, RA-Geweben oder beiden Gruppen für die entsprechenden Kategorien errechnet, welche anschließend zur Korrelationsanalyse herangezogen wurden. Die in der Korrelationsmatrix als signifikant markierten Korrelationen wurden nochmals einzeln durch einen separaten Spearman-Test überprüft. Für die graphische Darstellung als Punktediagramm wurde mit Hilfe von GraphPad Prism außerdem eine Regressionsgerade generiert. Anhand der Punkteverteilung in Bezug zur Ausgleichsgeraden wurde die Wahrscheinlichkeit zufällig entstandener Ergebnisse abgeschätzt und des Zufalls verdächtige Korrelationen verworfen. Die verbliebenen Korrelationen wurden zur Beurteilung herangezogen.

### 3.11.2 Statistik der Stimulationsversuche

Für die graphische Darstellung und die statistische Auswertung von Ergebnissen der Stimulationsversuche zu den Tetraspaninen wurde das Statistik-Programm GraphPad Prism (Version 6 und 8) verwendet. Zur Berechnung des x-fachen Unterschieds der Tetraspanin-Expression einer stimulierten Fibroblasten-Kultur bezogen auf die nicht stimulierte Kontroll-Kultur wurde die  $\Delta\Delta C_t$  Methode verwendet. Dabei wird zunächst für jede Population der Schwellenwertzyklus ( $C_t$ -Wert) des Referenzgens 18S rRNA vom  $C_t$ -Wert des untersuchten Tetraspanin-Gens subtrahiert. Nach dieser Normierung wird vom  $\Delta C_t$ -Wert der stimulierten Fibroblasten-Kultur der  $\Delta C_t$ -Wert der nicht stimulierten Kontroll-Kultur abgezogen. Der relative Expressionsunterschied ergibt sich anschließend aus der Formel  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  [107]. Aus den errechneten x-fach-Werten der Tetraspanin-Expression bezogen auf die Negativkontrolle wurden mittels GraphPad Prism die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet und durch ein Punktediagramm graphisch dargestellt. Verglichen wurden die IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) oder TNF $\alpha$  (10 ng/ml) stimulierten RASF mit der unstimulierten Kultur.

Da nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden konnte, wurden nicht-parametrische Statistikanalysen verwendet. Für die statistische Auswertung der proentzündlichen Reaktion der RASF wurde mittels GraphPad Prism ein multipler Vergleichstest nach Dunnett durchgeführt, welcher die IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  stimulierten RASF auf signifikante Unterschiede zur unstimulierten Kultur testete. Für die Ergebnissen der Stimulationsversuche zu den Tetraspaninen CD63, CD81 und CD151 wurde unter Verwendung einer One-Way ANOVA Analyse ein Kruskal-Wallis-Test für die Ergebnisse der OA- oder RA-Gruppe der einzelnen Tetraspanine durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % und die Variablen als unabhängig festgelegt. Signifikanzen wurden als  $p < 0,05$  (\*),  $p$ -Wert  $< 0,01$  (\*\*) und  $p < 0,001$  (\*\*\*) definiert und als solche im Graphen markiert. Gegenübergestellt wurden IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  stimulierte und unstimulierte RASF. Ergaben sich dabei signifikante Unterschiede wurde zusätzlich ein multipler Vergleichstest nach Dunn ergänzt, welcher alle Gruppen untereinander auf signifikante Unterschiede testete.

## **4. ERGEBNISSE**

Im Vorfeld wurden die Tetraspanine CD9, CD63, CD81 und CD151 aufgrund ihrer Eigenschaften und den Ergebnissen der Primer-Optimierung für die weitere Erforschung der Tetraspanin-Expression im Synovium von Patienten mit rheumatoider Arthritis ausgewählt. Bei den in unserem Forschungslabor etablierten Daten zum Tetraspanin CD82 im Rahmen der Studie „Tetraspanin CD82 beeinflusst die Migration, Anhaftung und Invasion von Synovialfibroblasten der rheumatoiden Arthritis“ [29] wurde bereits die Basis bezüglich histologischer Untersuchungen eines Tetraspanins und deren Auswertung geschaffen.

### **4.1 Etablierung der immunhistologischen Färbungen**

#### **4.1.1 Etablierung zum Tetraspanin CD63**

##### **4.1.1.1 Etablierung der Immunhistochemie**

Die Etablierung des Tetraspanins CD63 wurde anhand einer Immunfluoreszenz (IF) mit Gefrierschnitten aus Synovium von RA-Patienten mit dem etablierten Protokoll für das CD82 begonnen und unterschiedliche Konzentrationen des polyklonalen Primärantikörpers gegen CD63 (proteintech) getestet. Das zugrunde liegende Basisprotokoll für die Immunfluoreszenz ist unter Kapitel 3.3 beschrieben. Als Negativkontrolle wurde das Lösungsmittel des Primärantikörpers verwendet. Ein in Kaninchen generierter, monoklonaler anti-humaner Isotyp (abcam) wurde in einer der Menge des CD63-AKs entsprechenden Verdünnung als zusätzliche Kontrolle parallel aufgetragen. Zur Optimierung des CD63-AKs wurden zwei Verdünnungen 1:50 und 1:500 (gelöst in PBS mit 10 % BSA) entsprechend der Herstellerempfehlungen geprüft. Ein rot fluoreszierender Sekundärantikörper (ThermoFisher) wurde anschließend hinzugegeben. Weiterhin wurden die Zellkerne wie unter Kapitel 3.3 beschrieben mit DAPI gefärbt. Unter Verwendung der aufgeführten Bedingungen ergaben sich unspezifische Signale in der verwendeten Isotypkontrolle sowie kaum CD63-Signale, die sich vom Hintergrund abhoben

Aufgrund der unspezifischen Signale wurde zunächst eine immunhistochemische Färbung anstelle der IF durchgeführt. Zur Etablierung des CD63-Nachweises wurde parallel die etablierte CD82-Färbung (abcam, 1:200 in PBS) als Positivkontrolle für das eingesetzte Sekundärsystem mitgeführt. Das Basisprotokoll der Immunhistochemie ist unter Kapitel 3.2 beschrieben. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte diesmal über Nacht bei 4 °C. Verwendet wurde ein in Kaninchen generierter, monoklonaler, anti-

humaner Isotyp (abcam, 1:100 in PBS). Die Verdünnungsempfehlung des CD63-AKs nach Hersteller lag für eine IHC im Bereich von 1:50 bis 1:500, daher wurde eine Verdünnung von 1:300 in PBS mit Inkubation über Nacht bei 4°C gewählt. Geblockt wurde mit 2 % BSA. Bereits nach einer Entwicklungszeit von zwei Minuten zeigten sich bei CD63 unspezifische Signale in der Negativkontrolle und Isotypkontrolle, aber auch ein stärkeres Signal des CD63-AKs über dem Hintergrund war zu beobachten. Die unspezifischen Signale in Negativ- und Isotypkontrolle waren ebenfalls bei der Positivkontrolle mit CD82 erkennbar. Aufgrund des nicht optimalen Blockings und einer möglichen Problematik im sekundären Nachweissystem wurden verschiedene Variablen überprüft, die in Tab. 33 zusammengestellt sind. Zudem wurde eine in Kaninchen generierte, polyklonale, anti-humane Isotypkontrolle (biorbyt) verwendet. In allen Varianten fiel das Signal des CD63-AKs stark aus, während die Isotypkontrolle nur ein schwaches bis kein Signal zeigte. Das beste Resultat ergab sich aus der Kombination 5 % Milchpulver-Block und dem Lösen der AK in PBS. Dieses IHC-Protokoll wurde als Standard für den Nachweis von CD63 in verschiedenen OA- und RA- Geweben verwendet.

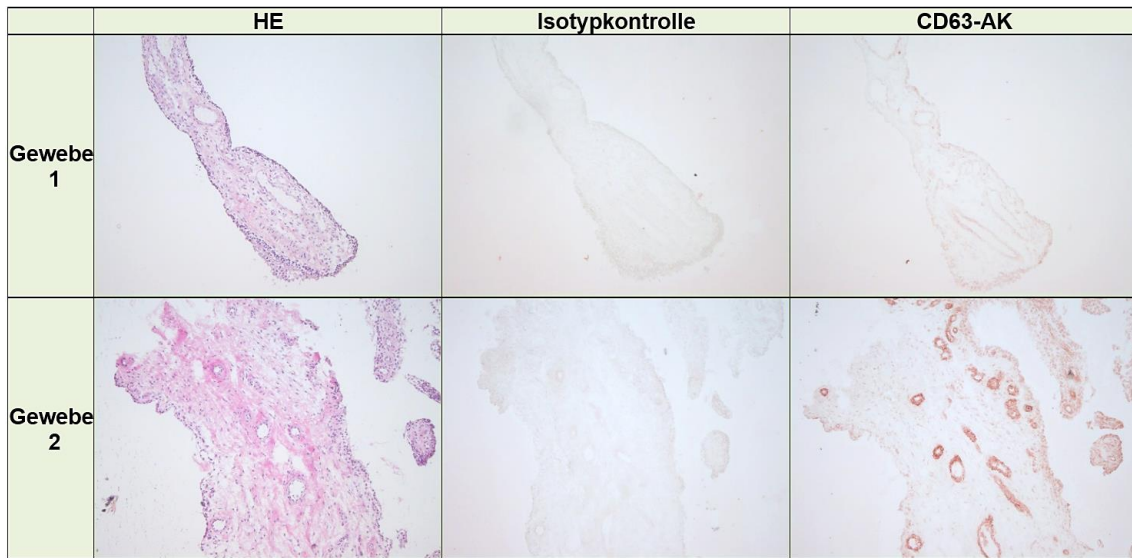
**Tab. 33: Getestete Varianten des Immunhistochemie-Protokolls für CD63**  
(NK (Negativkontrolle), Iso (Isotypkontrolle), AK (CD63-Antikörper))

| Blocken         | CD63-AK                  | Gewebe | Entwicklung | Ergebnis Signal                                  |
|-----------------|--------------------------|--------|-------------|--|
| 2 % BSA         | 1:150 in PBS             | RA     | 2 min       | NK, Iso: unspezifisch<br>AK: spezifisches Signal |
| 5 % Serum Ziege | 1:300 in PBS             | RA     | 2 min       | Iso: schwaches Signal<br>AK: starkes Signal      |
| 5 % Milchpulver | 1:300 in PBS             | RA     | 3 min       | Iso: kein Signal<br>AK: starkes Signal           |
| 5 % Milchpulver | 1:300 in 5 % Milchpulver | RA     | 4 min       | Iso: schwaches Signal<br>AK: starkes Signal      |

#### 4.1.1.2 Verifikation des Immunhistochemie-Protokolls auf Gewebeproben zum Nachweis von CD63 im RA- und OA-Synovium

Nach Etablierung des IHC-Protokolls für CD63 wurden, wie unter Kapitel 3.10.1.1 beschrieben, Synovialgewebe von OA- und RA-Patienten ausgewählt, anhand derer die Expression von CD63 untersucht wurde. Zur Reduktion von methodischer Variabilität wurden alle OA-Gewebe in einem IHC-Ansatz parallel gefärbt. Bei Gewebeproben, die bei vorherigen Färbungen in der Isotypkontrolle im Gegensatz zur Negativkontrolle einen leichten unspezifischen Hintergrund aufwiesen, wurde die Isotypkontrolle bei der Färbung mitgeführt. Dabei bestätigten sich die zuvor bereits aufgetretenen unterschiedlichen Signalstärken des CD63-AKs zwischen den einzelnen Gewebeproben (vgl. Abb. 10). Die Endzahl der Gewebeproben wurde daraufhin auf 15 Proben erhöht.

Auch die IHCs der RA-Gewebebeobachtungen sollten in einem einzelnen IHC-Ansatz gefärbt werden.



**Abb. 10: Beispiel der unterschiedlichen Signalstärke des CD63-Antikörpers zwischen zwei Gewebebeobachtungen bei der Immunhistochemie**

Beispielhaft dargestellt ist der Unterschied der Signalstärke des CD63-Antikörpers zwischen verschiedenen Gewebebeobachtungen in der Gewebeübersicht (100-fach). So zeigt der CD63-Antikörper bei einigen Geweben nur ein sehr schwaches Signal (Gewebe 1), während sich bei anderen Geweben ein deutlich rotes Signal des CD63-Antikörpers, insbesondere im Bereich der Gefäßwände darstellt (Gewebe 2). Dazugehörige Isotypkontrolle und Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Gewebes sind abgebildet.

Bei der Färbung der Gewebe verschiedener Patienten traten Problematiken beim Färben der bei -20 °C gelagerten seriellen Gewebeschnitte auf. Die fehlerhafte Färbung am Geweberand ohne Färbung der Gewebemitte entstand vermutlich durch Eiskristall- bzw. Kondenswasser-Bildung auf den Schnitten bei Entnahme sowie unterschiedlichen Raumtemperaturen. Zudem konnte ein Einfluss der Peroxidaseblockade bei der CD63-IHC beobachtet werden, der bei dem verwendeten Nachweissystem benötigt wird. Da in der IF der Schritt der Peroxidase-Blockade nicht notwendig ist und die Färbeproblematik der bei -20°C gelagerten Schnitte im direkten Vergleich nicht auftrat, erfolgte der Nachweis von CD63 in je 15 RA- und OA-Geweben per Immunfluoreszenz.

#### 4.1.1.3 Etablierung Immunfluoreszenz

Anhand eines etablierten IF-Basisprotokolls (s. Kapitel 3.3) wurde die IF unter Verwendung der AK-Konzentrationen und Block-Variante aus der zuvor durchgeführten IHC mit einem Block mittels 5 % Milchpulver, einer in Kaninchen generierten, polyklonalen, anti-humanen Isotypkontrolle (biorbyt, 1:900 in PBS) sowie den CD63-AK (proteintech, 1:300 in PBS) durchgeführt. Der Fluoreszenznachweis wurde mittels des roten Fluorochroms Dylight 649 (BioLegend, 1:500 in PBS) mit Cy3 (Jackson-ImmunoResearch, Fluorochrom Indocarbocyanin, 1:500 in PBS) verglichen.

Die Signale erschienen schwach (Cy3) oder fehlten (Dylight 649), weshalb die Konzentrationen der Sekundär-AK auf 1:100 erhöht wurde, sowie zusätzlich ein FITC-markierter AK eingesetzt wurde (abcam, Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat 1:100 in PBS). Im Gegensatz zu den mit Dylight 649- oder FITC-markierten AK ergab der Cy3-markierte AK ein stärkeres Signal, wurde aber aufgrund des starken Signals in einer stärkeren Verdünnung von 1:250 getestet. In dieser Verdünnung ergab sich ein gutes, reproduzierbares Signal, sodass das verwendete Protokoll als Standard festgelegt wurde (s. Kapitel 3.3 und Tab. 22) und auf allen OA- und RA-Geweben angewendet wurde. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu erzielen, wurden alle Gewebe jeweils in einem IF-Durchlauf mit jeweils einer Isotypkontrolle gefärbt. Mittels Mikroskop und digitaler Kamera wurden die Gewebeschnitte anschließend unter gleichen Mikroskop- und Belichtungseinstellungen in verschiedenen Vergrößerungen fotografiert und dokumentiert.

#### **4.1.1.4 Auswertung der Immunfluoreszenzsignale von CD63**

Zur Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbung von CD63 auf 15 OA- und 15 RA-Geweben wurden die dokumentierten Aufnahmen der Schnitte anhand der in den Methoden beschriebenen Scores zur Auswertung der IF-Färbungen (s. Kapitel 3.10.1.3) und den dazugehörigen Umgebungsbedingungen ausgewertet. Repräsentative Bilder sind in Abb. 12 dargestellt. Hierbei lag der Fokus auf der Verteilung der CD63-Signale, während die Intensität der Signale in einem späteren Kapitel mittels eigenen Scores gesondert betrachtet wird (s. Kapitel 4.1.6). Die Ergebnisse sind in Tab. 34 dargestellt. Bei den Gefäßen konnten generell keine Unterschiede zwischen arteriellem und venösem Gefäß bezüglich der Färbung festgestellt werden (nicht in Tab. 34 dargestellt). Bei der Auswertung fielen bei den CD63-Signalen besondere Färbemuster in den Bereichen der Zellkerne und Aussparungen innerhalb der Gefäßwand auf (vgl. Kapitel 3.10.1.3 und Abb. 7). Um dies genauer zu untersuchen und zu quantifizieren, wurden diese Merkmale ebenfalls mittels des Scores zur Auswertung der IF-Färbungen für CD63 ausgewertet (s. Tab. 35). Betrachtet wurde dabei nur die größte Vergrößerung (400x).

Der Datensatz der Score-Ergebnisse zu den Grund- sowie Spezialkategorien wurde graphisch ausgewertet (s. Abb. 11). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen OA und RA innerhalb der einzelnen Kategorien.

Wurde das arithmetische Mittel der in die Kategorien eingeschlossenen Gewebe betrachtet, zeigte sich durchschnittlich eine starke Färbung im gesamten Gewebe für die

Areale *lining layer*, Gefäße und *sublining*. Ein geringer Unterschied zwischen OA- und RA-Gewebe ließ sich hierbei nur bei den Signalen in Endothelzellen beobachten. So tendieren RA-Gewebe in diesem Areal zu einer mittelstarken Färbung, welche etwa die Hälfte des Gewebes betrifft, während sich bei OA-Gewebe eine starke Färbung im gesamten Gewebe verzeichnen lässt. Infiltrate konnten sowohl bei OA- als auch bei RA-Gewebe nur in wenigen Proben gefunden werden (n=3 und n=4). Jedoch fiel auf, dass Infiltrate ausnahmslos eine starke Färbung aufwiesen.

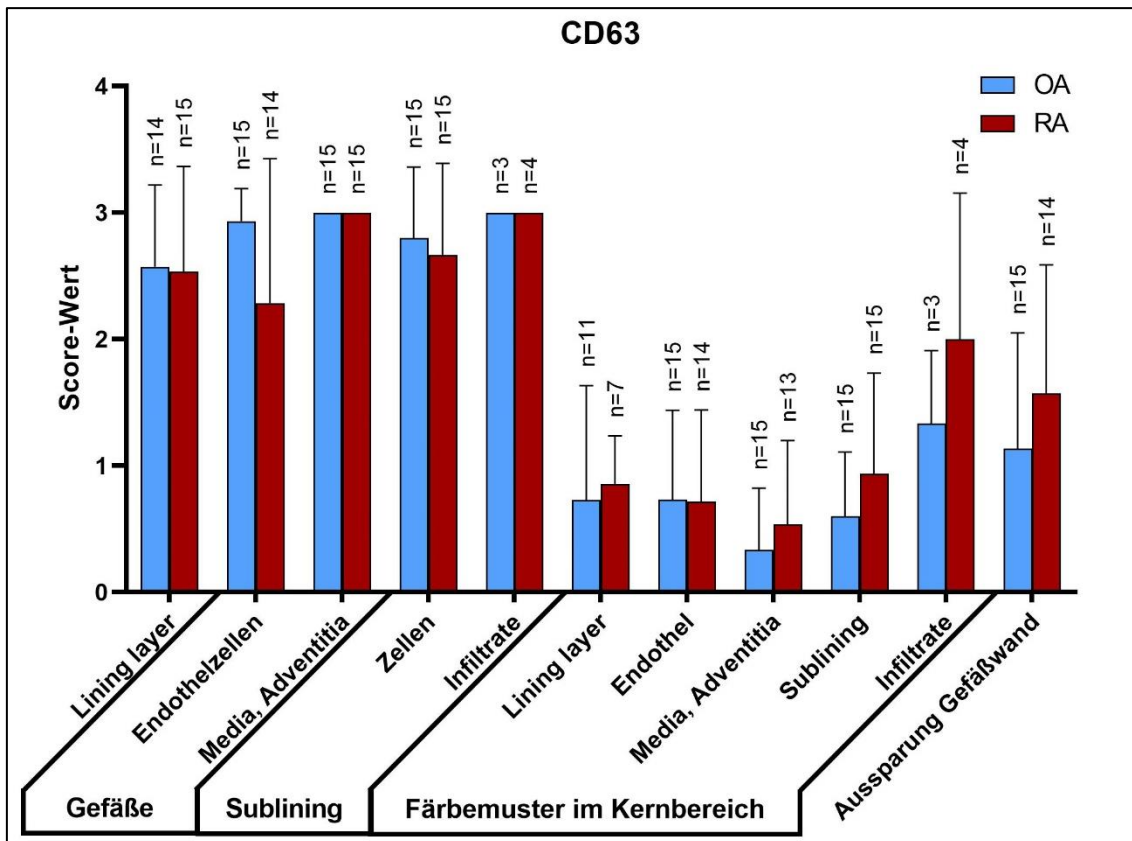
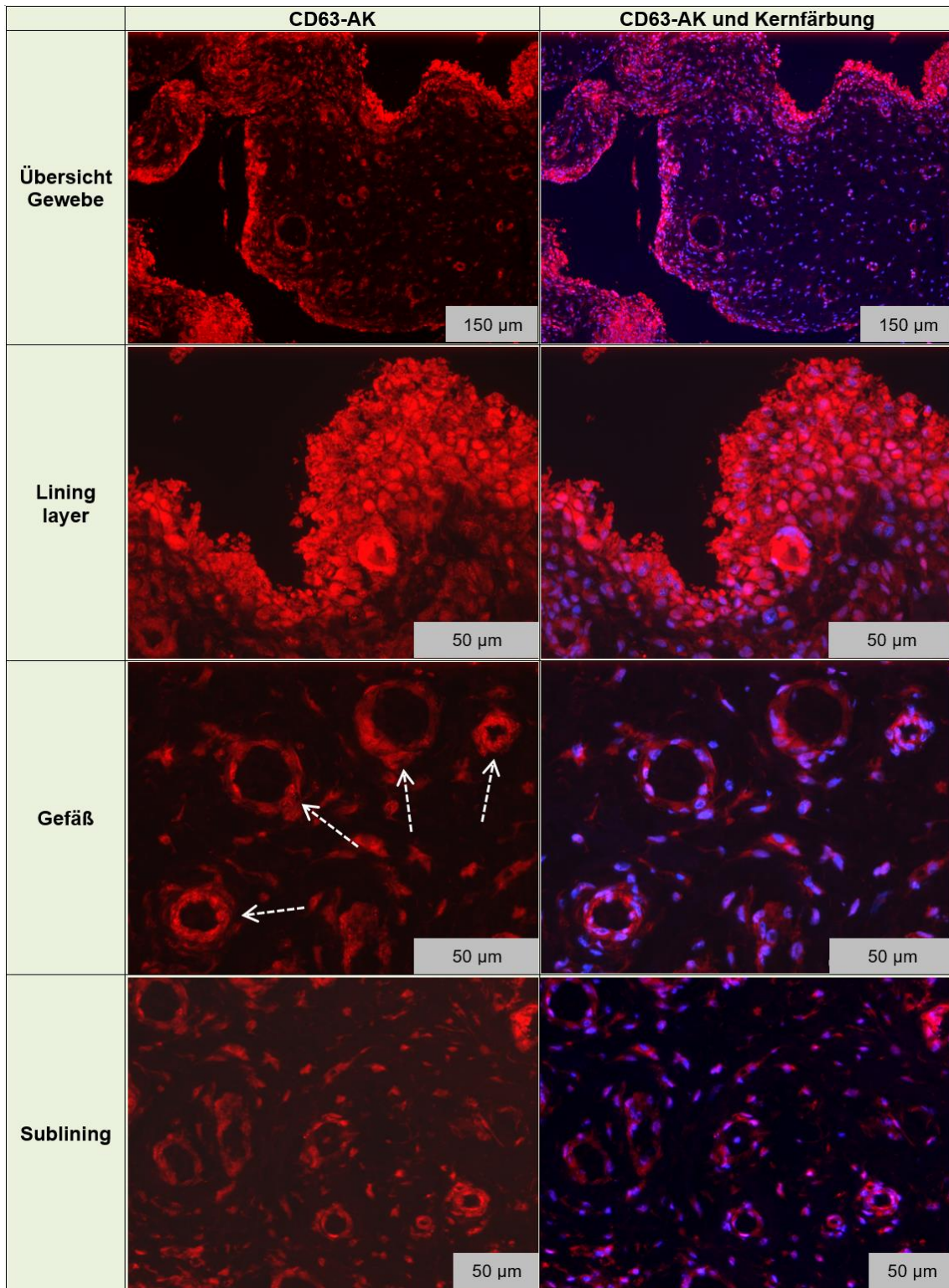


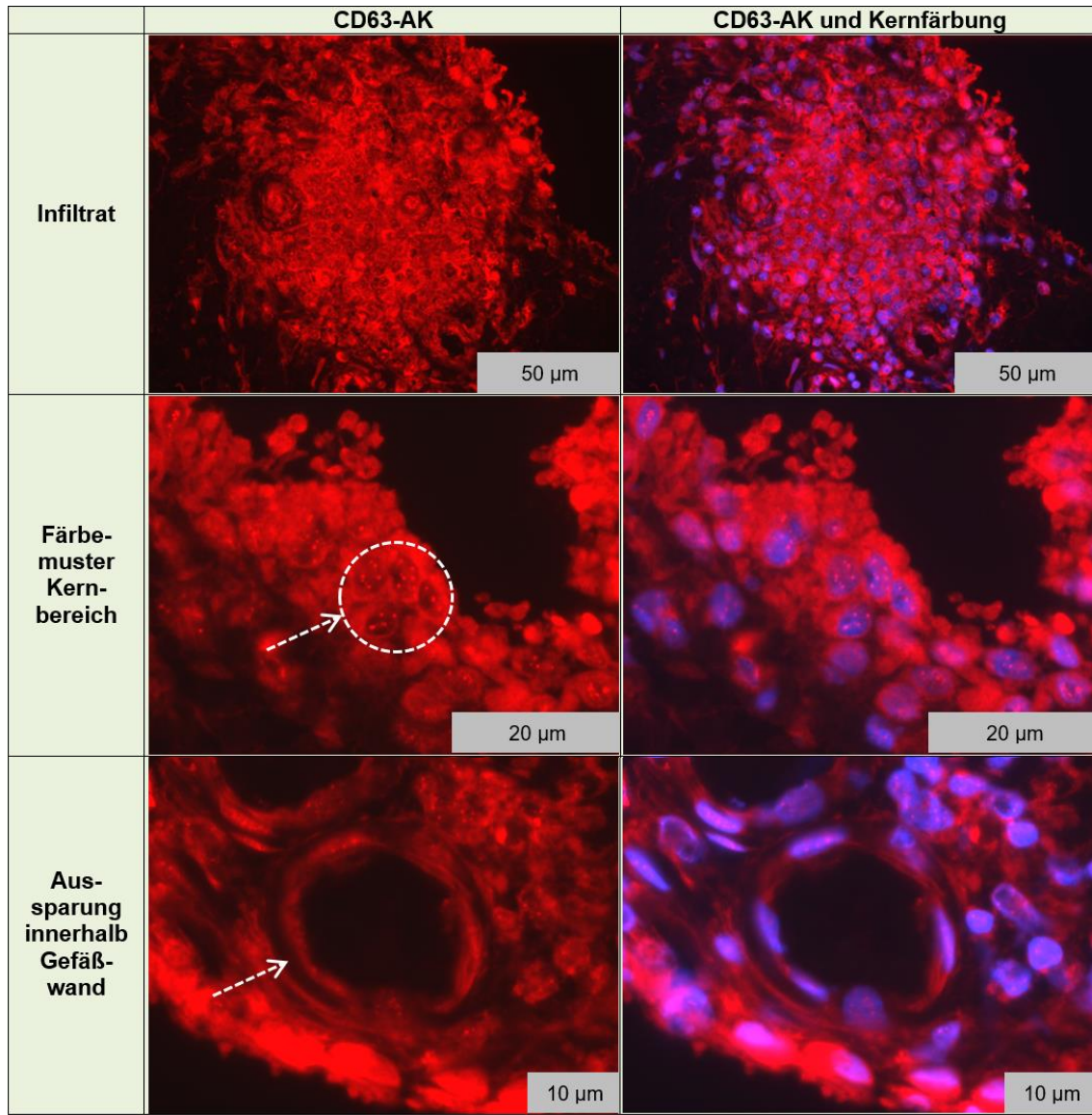
Abb. 11: Durchschnittliche Score-Werte der Immunfluoreszenz-Auswertungskategorien für CD63

Dargestellt sind für jede Kategorie, welche bei der Immunfluoreszenz-Färbung unter Verwendung des CD63-Antikörpers bewertet wurde, die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Score-Werte für OA (blau) bzw. RA (rot). Die Anzahl der für jede Kategorie bewerteten Gewebe ist als Stichprobenumfang (n) dargestellt. Score-Werte sind definiert als „Kategorie/ Areal nicht vorhanden“ (-), „keine Färbung/ nichtzutreffend“ (0), „wenige Bereiche oder einzelne Zellen gefärbt/ bei einzelnen Gefäßen zutreffend“ (1), „mittelstarke Färbung, die mindestens die Hälfte der Probe betrifft/ für mindestens die Hälfte der Gefäße zutreffend“ (2) und „der Großteil der Probe ist mittel bis stark gefärbt/ für den Großteil der Gefäße zutreffend“ (3).

Die Spezialkategorie des Färbemusters im Bereich der Zellkerne konnte nur in vereinzelten Geweben und dort nur in einigen Zellen der verschiedenen Gewebeareale gefunden werden. Nur wenige bis keine der Zellen im *lining layer*, Endothel, Media/Adventitia und *sublining* zeigten ein solches Färbemuster im Bereich ihrer Kerne.

Etwas häufiger konnte das Färbemuster im Bereich der Kerne von Zellen in Infiltraten beobachtet werden (Abb. 12). Bei RA-Geweben wies etwa die Hälfte der Zellen im Infiltrat eine solche Färbung auf. Eine Aussparung der Färbung in Gefäßwänden ließ sich ebenso nur in vereinzelt Gefäßen des Gewebes erkennen, RA-Gewebe hier mit einer gering höheren Tendenz.





**Abb. 12: Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbung eines Gewebes für CD63**

Die Abbildung zeigt ein Gewebe, welches das Ergebnis der Immunfluoreszenz-Färbung zum Tetraspanin CD63 repräsentativ darstellt. Zellen des *lining layer*, der Gefäße (s. Pfeile) und des *sublinings* zeigen für das gesamte Gewebe ein starkes CD63-Signal (rot fluoreszierend). DAPI-gefärbte Zellkerne sind blau fluoreszierend. Auch ein in diesem Gewebe enthaltenes Infiltrat weist ein starkes Signal aller Zellen auf. Nicht repräsentativ für das Gesamtergebnis der CD63-Immunfluoreszenz-Färbung, aber in diesem Gewebe ebenfalls auffällig, sind die in einigen Geweben beobachteten isolierten Signale des CD63-Antikörpers im Kernbereich einiger Zellen (s. eingekreiste Zellen) und eine Aussparung in der Gefäßwand eines Gefäßes (s. Pfeil).

**Tab. 34: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Signale für CD63 in den Grundkategorien für alle OA- und RA-Gewebe**

Score-Werte sind definiert als „Kategorie/Areal nicht vorhanden“ (-), „keine Färbung/nichtzutreffend“ (0), „wenige Bereiche oder einzelne Zellen gefärbt“ (1), „mittelstarke Färbung, die mindestens die Hälfte der Probe betrifft“ (2) und „der Großteil der Probe ist mittel bis stark gefärbt“ (3).

| Gewebeprobe | Lining layer | Gefäße         |                   | Sublining |            |
|-------------|--------------|----------------|-------------------|-----------|------------|
|             |              | Endothelzellen | Media, Adventitia | Zellen    | Infiltrate |
| OA          | OA358 Syn7   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | OA379 Syn5   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | OA382 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA391 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | OA393 Syn4   | 2              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA398 Syn4   | 3              | 2                 | 3         | -          |
|             | OA413 Syn3   | 2              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA415 Syn4   | 1              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA417 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA418 Syn2   | 2              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA419 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA425 Syn4   | -              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA476 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | 1          |
|             | OABN93 Syn4  | 2              | 3                 | 3         | 2          |
|             | OABN95 Syn4  | 3              | 3                 | 3         | -          |
| n           | 14           | 15             | 15                | 15        | 3          |
| RA          | RA375 Syn3   | 3              | 2                 | 3         | 1          |
|             | RA376 Syn2   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA382 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA384 Syn4   | 3              | 0                 | 3         | 3          |
|             | RA385 Syn2   | 3              | -                 | 3         | -          |
|             | RA386 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA389 Syn2   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA391 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | RA397 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA402 Syn4   | 1              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA406 Syn4   | 1              | 1                 | 3         | 2          |
|             | RA419 Syn2   | 3              | 2                 | 3         | 3          |
|             | RA421 Syn3   | 2              | 3                 | 3         | 3          |
|             | RA434 Syn4   | 3              | 0                 | 3         | 1          |
|             | RABN23 Syn3  | 1              | 3                 | 3         | -          |
| n           | 15           | 14             | 15                | 15        | 4          |

**Tab. 35: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Signale für CD63 in den Spezialkategorien für alle OA- und RA-Gewebe**

Score-Werte sind definiert als „Kategorie/ Areal nicht vorhanden“ (-), „keine Färbung/ nichtzutreffend“ (0), „wenige Bereiche oder einzelne Zellen gefärbt/ bei einzelnen Gefäßen zutreffend“ (1), „mittelstarke Färbung, die mindestens die Hälfte der Probe betrifft/ für mindestens die Hälfte der Gefäße zutreffend“ (2) und „der Großteil der Probe ist mittel bis stark gefärbt/ für den Großteil der Gefäße zutreffend“ (3).

| Gewebeprobe | Färbemuster im Zellkernbereich |           |                   |           |            | Aussparung innerhalb der Gefäßwand |   |
|-------------|--------------------------------|-----------|-------------------|-----------|------------|------------------------------------|---|
|             | Lining layer                   | Endothel  | Media, Adventitia | Sublining | Infiltrate |                                    |   |
| OA          | OA358 Syn7                     | 0         | 1                 | 0         | 1          | 1                                  | 0 |
|             | OA379 Syn5                     | 1         | 1                 | 1         | 0          | 1                                  | 1 |
|             | OA382 Syn3                     | 1         | 2                 | 1         | 0          | -                                  | 1 |
|             | OA391 Syn4                     | 3         | 2                 | 1         | 1          | 2                                  | 1 |
|             | OA393 Syn4                     | 0         | 0                 | 0         | 0          | -                                  | 3 |
|             | OA398 Syn4                     | 1         | 1                 | 0         | 1          | -                                  | 1 |
|             | OA413 Syn3                     | 1         | 1                 | 0         | 1          | -                                  | 1 |
|             | OA415 Syn4                     | -         | 1                 | 0         | 1          | -                                  | 2 |
|             | OA417 Syn4                     | 0         | 0                 | 0         | 1          | -                                  | 0 |
|             | OA418 Syn2                     | 0         | 0                 | 0         | 1          | -                                  | 1 |
|             | OA419 Syn3                     | 0         | 0                 | 0         | 0          | -                                  | 3 |
|             | OA425 Syn4                     | -         | 0                 | 0         | 1          | -                                  | 1 |
|             | OA476 Syn3                     | 1         | 1                 | 1         | 0          | -                                  | 1 |
|             | OABN93 Syn4                    | -         | 0                 | 0         | 0          | -                                  | 0 |
|             | OABN95 Syn4                    | -         | 1                 | 1         | 1          | -                                  | 1 |
| <b>n</b>    | <b>11</b>                      | <b>15</b> | <b>15</b>         | <b>15</b> | <b>3</b>   | <b>15</b>                          |   |
| RA          | RA375 Syn3                     | -         | 0                 | 0         | 0          | -                                  | 2 |
|             | RA376 Syn2                     | 1         | 1                 | 1         | 1          | -                                  | 2 |
|             | RA382 Syn3                     | -         | 1                 | 1         | 1          | -                                  | 1 |
|             | RA384 Syn4                     | -         | -                 | -         | 1          | 1                                  | 1 |
|             | RA385 Syn2                     | 1         | 0                 | -         | 0          | -                                  | - |
|             | RA386 Syn4                     | -         | 0                 | 0         | 1          | -                                  | 1 |
|             | RA389 Syn2                     | 0         | 0                 | 0         | 0          | -                                  | 2 |
|             | RA391 Syn3                     | 1         | 0                 | 0         | 1          | 1                                  | 3 |
|             | RA397 Syn3                     | -         | 1                 | 0         | 1          | -                                  | 0 |
|             | RA402 Syn4                     | -         | 1                 | 0         | 0          | -                                  | 1 |
|             | RA406 Syn4                     | 1         | 0                 | 0         | 1          | -                                  | 0 |
|             | RA419 Syn2                     | -         | 2                 | 2         | 1          | 3                                  | 3 |
|             | RA421 Syn3                     | 1         | 1                 | 1         | 1          | 3                                  | 1 |
| RA434 Syn4  | 1                              | 1         | 1                 | 2         | -          | 2                                  |   |
| RABN23 Syn3 | -                              | 2         | 1                 | 3         | -          | 3                                  |   |
| <b>n</b>    | <b>7</b>                       | <b>14</b> | <b>13</b>         | <b>15</b> | <b>4</b>   | <b>14</b>                          |   |

## 4.1.2 Etablierung zum Tetraspanin CD81

### 4.1.2.1 Etablierung der Immunhistochemie

Analog zum Etablierungsstart von CD63 wurde auch bei der Etablierung von CD81 zunächst eine Immunfluoreszenz nach CD82-Protokoll (s. Kapitel 4.1.1) mit den Verdünnungen des polyklonalen Primärantikörpers gegen CD81 (bioby) von 1:100 und 1:600, entsprechend des vom Hersteller empfohlenen Verdünnungsbereiches, durchgeführt. Das zugrundeliegende Basisprotokoll der Immunhistochemie ist unter Kapitel 3.2 beschrieben. Es zeigten sich wie bei CD63 unspezifische Signale in der Isotypkontrolle und wenige, sich vom Hintergrund abhebende Signale für CD81. So wurde auch für dieses Tetraspanin die Etablierung mittels Immunhistochemie fortgeführt. Beim ersten Etablierungsschritt auf RA-Gewebe mit einem monoklonalen, in Kaninchen generierten, anti-humanen Isotyp (abcam) sowie dem polyklonalen Primärantikörper gegen CD81 (1:300 in PBS) waren unspezifische Signale in Negativ- und Isotypkontrolle und ein Signal des CD81-AKs erkennbar. Die Etablierung wurde unter Verwendung eines polyklonalen, in Kaninchen generierten, anti-humanen Isotyp (bioby) sowie weiteren Variationen des Blockens fortgesetzt, die jedoch keine optimale Färbung erzielten (s. Tab. 36). Verschiedene Variationen, wie die Erhöhung der Konzentration des CD81-AKs, der Inkubationsdauer des Primärantikörpers und die Verwendung verschiedener Kontrollgewebe mit bekannter CD81-Expression, führten nicht zur erfolgreichen Etablierung des verwendeten Antikörpers auch unter Verwendung von Geweben, die eine CD81-Expression aufweisen (s. Tab. 36).

**Tab. 36: Getestete Varianten des Immunhistochemie-Protokolls für CD81**  
(NK (Negativkontrolle), Iso (Isotypkontrolle), AK (CD81-Antikörper))

| Blocken         | CD81-AK                  | Gewebe | Entwicklung | Ergebnis Signal   |
|-----------------|--------------------------|--------|-------------|---|
| 2 % BSA         | 1:300 in PBS             | RA     | 2 min       | NK, Iso: unspezifisch<br>AK: spezifisches Signal                  |
| 5 % Serum Ziege | 1:300 in PBS             | RA     | 3 min       | Iso: zelluläres Signal, stark<br>AK: kein Signal (Schnitt defekt) |
| 5 % Milchpulver | 1:300 in PBS             | RA     | 5 min       | Iso: zelluläres Signal, schwach<br>AK: kaum/kein Signal           |
| 5 % Milchpulver | 1:300 in 5 % Milchpulver | RA     | 6 min       | Iso: kaum, außer eine Stelle<br>AK: kein Signal außer eine Stelle |
| 10 % BSA        | 1:300 in PBS             | OA     | 7 min       | Iso: stark (Schnitt defekt)<br>AK: kein Signal                    |
| 5 % BSA         | 1:300 in 5 % BSA         | OA     | 6 min       | Iso: zelluläres Signal, schwach<br>AK: kein Signal                |
| 5 % BSA         | 1:300 in PBS             | OA     | 10 min      | Iso: zelluläres Signal, schwach<br>AK: kein Signal                |
| 2 % BSA         | 1:100 in PBS             | OA     | 8 min       | Iso: extrem starkes Signal<br>AK: schwaches Signal                |

| Blocken      | CD81-AK                    | Gewebe                    | Entwicklung | Ergebnis Signal   |
|--------------|----------------------------|---------------------------|-------------|---|
| 5 % BSA      | 1:300 in PBS               | Lunge                     | 7 min       | Iso: kein/kaum Signal<br>AK: etwas stärkeres Signal                 |
| 5 % BSA      | 1:300 in PBS               | OA, RA                    | 7 min       | Iso: schwaches / kaum<br>AK: defekt / stärkeres Signal              |
| 10 % BSA-Mix | 1:300 in PBS               | Lunge, RA                 | 4 min       | Iso: zelluläres / stark zellulär<br>AK: wie im Iso / schwächer      |
| 10 % BSA-Mix | 1:100 in PBS<br>1h 4 °C    | Lunge, RA                 | 8 min       | Iso: schwach / zellulär<br>AK: etwas stärker / kaum                 |
| 10 % BSA-Mix | 1:100 in 5%<br>BSA 1h 4 °C | Lunge                     | 8 min       | Iso: zelluläre Signale<br>AK: etwas schwächer als Iso               |
| 5 % BSA      | 1:300 in PBS               | Gehirn<br>(Paraffin)      | 23 min      | Iso: kein Signal<br>AK: kein Signal                                 |
| 5 % BSA      | 1:300 in PBS               | Niere, Fett<br>(Paraffin) | 10 min      | Iso: Signal Tubuli / rot (defekt)<br>AK: Tubuli / Hintergrundsignal |

Da der polyklonale, in Kaninchen generierte, anti-humane CD81-Antikörper nicht etabliert werden konnte, wurde ein monoklonaler, in Maus generierter, anti-humaner CD81-Antikörper (abcam) eingesetzt (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Undraga Schagdarsurengin, Biomedizinisches Forschungszentrum Seltersberg in Gießen).

#### 4.1.2.2 Etablierung der Immunfluoreszenz

Der CD81-AK (abcam) wurde in dem unter Kapitel 3.3 beschriebenen Immunfluoreszenz-Protokoll angewendet. Ein monoklonaler, in Maus generierter, anti-humaner Vimentin-AK (Dako) wurde als Kontrolle des Sekundärsystems mitgeführt. Vimentin ist ein Intermediärfilament und liegt im Zytoplasma aller Zellen mesenchymaler Herkunft wie beispielsweise Fibroblasten, Endothelzellen oder glatten Muskelzellen vor und lässt sich aus diesem Grund als Positivkontrolle im Synovialgewebe einsetzen.

Die IF-Färbung beinhaltete ein Blocken mit 5 % BSA, eine monoklonale, in Maus generierte, anti-humane Isotypkontrolle (BD Pharmingen, 1:250 in PBS) sowie den Vimentin-AK (1:100 in PBS) und den CD81-AK (1:1000 in PBS). Als Nachweissystem wurde der polyklonale Sekundär-AK Alexa Fluor 488 (ThermoFisher, in Ziege generiert, Anti-Maus, 1:500 in PBS) verwendet. Es zeigte sich ein spezifisches Signal des verwendeten CD81-AKs. Das etablierte IF-Protokoll (s. Kapitel 3.3 und Tab. 23) wurde anschließend auf allen 15 OA- und 15 RA-Geweben in jeweils einem IF-Durchlauf zur Auswertung der CD81-Expression angewendet und mittels Mikroskops und digitaler Kamera in verschiedenen Vergrößerungen fotografisch dokumentiert. Für jeden Immunfluoreszenz-Durchlauf wurde eine Isotypkontrolle mitgeführt.

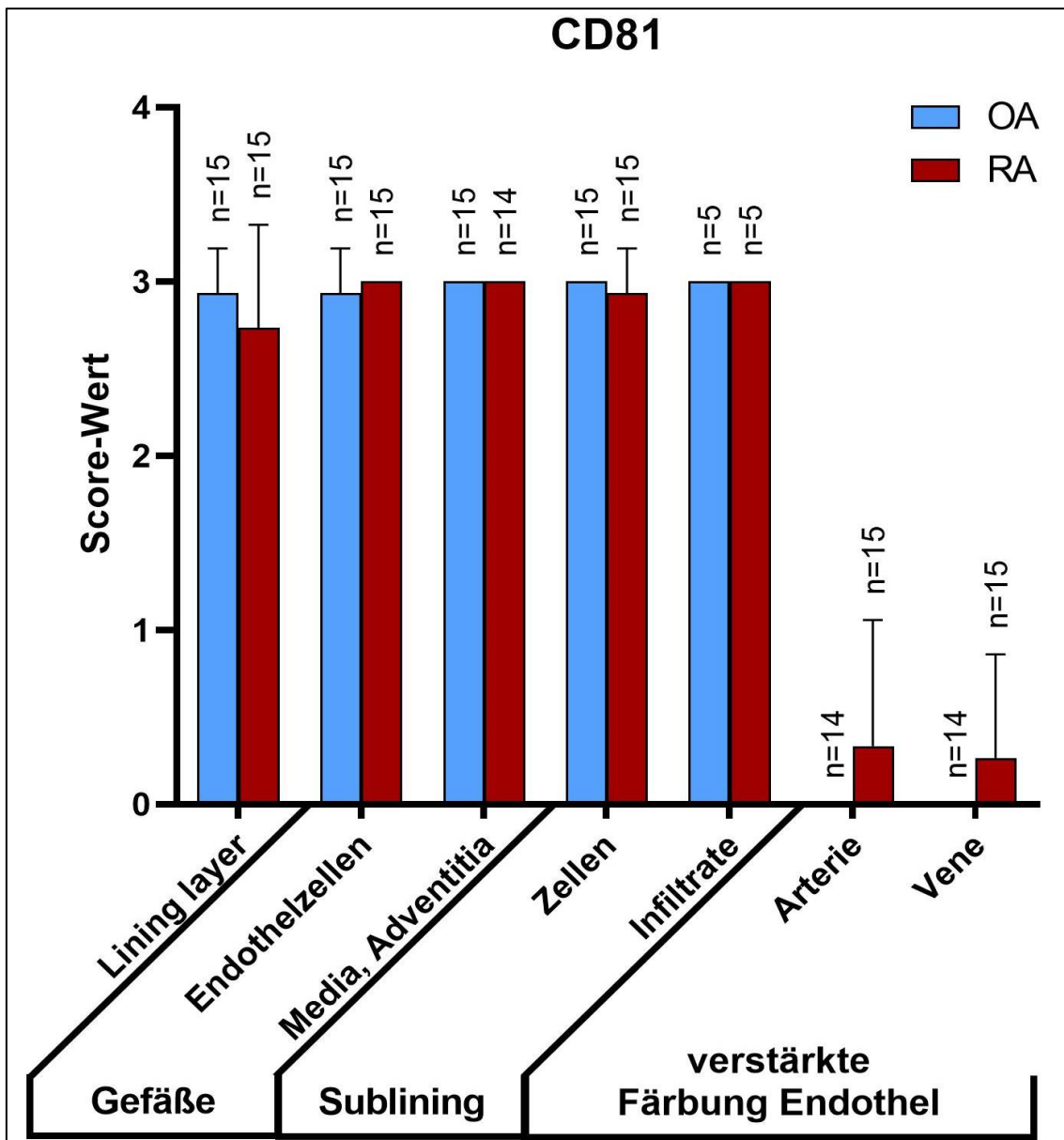
#### 4.1.2.3 Auswertung der Immunfluoreszenzsignale von CD81

Zur Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbung von CD81 auf 15 OA- und 15 RA-Gewebe wurden die Aufnahmen der Schnitte anhand des in den Methoden beschriebenen Scores zur Auswertung der IF-Färbungen (s. Kapitel 3.10.1.3) und den dazugehörigen Umgebungsbedingungen ausgewertet. Repräsentative Bilder sind in Abb. 14 dargestellt. Hierbei lag der Fokus auf der Verteilung der AK-Signale, während die Intensität der Signale in einem späteren Kapitel mittels eigenen Scores gesondert betrachtet wird (s. Kapitel 4.1.6). Die Ergebnisse sind in Tab. 37 dargestellt. Bei den Gefäßen konnten generell keine Unterschiede zwischen arteriellem und venösem Gefäß bezüglich der Färbung festgestellt werden (nicht in Tab. 37 dargestellt). Bei der Auswertung des Tetraspanins CD81 fiel teilweise eine verstärkte Färbung des Endothels im Vergleich zur Media bzw. Adventitia auf (vgl. Kapitel 3.10.1.3 und Abb. 8). Um dies genauer zu quantifizieren, wurden diese Merkmale ebenfalls mittels des Scores zur Auswertung der IF-Färbungen ausgewertet (s. Tab. 38). Betrachtet wurde dabei nur die größte Vergrößerung (400x).

Der Datensatz der Score-Ergebnisse zu Grund- und Spezialkategorien wurde graphisch ausgewertet (s. Abb. 13). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen OA und RA innerhalb der einzelnen Kategorien. Wurde das arithmetische Mittel der in die Kategorien eingeschlossenen Gewebe betrachtet, zeigte sich im Mittel eine starke Färbung im gesamten Gewebe für die Areale *lining layer*, Gefäße und *sublining*. Unterschiede zwischen OA- und RA-Gewebe wurden hierbei nicht beobachtet. Infiltrate konnten sowohl bei OA- als auch bei RA-Gewebe nur in jeweils fünf Proben gefunden werden. Dabei fiel auf, dass Infiltrate ausnahmslos eine starke Färbung aufwiesen.

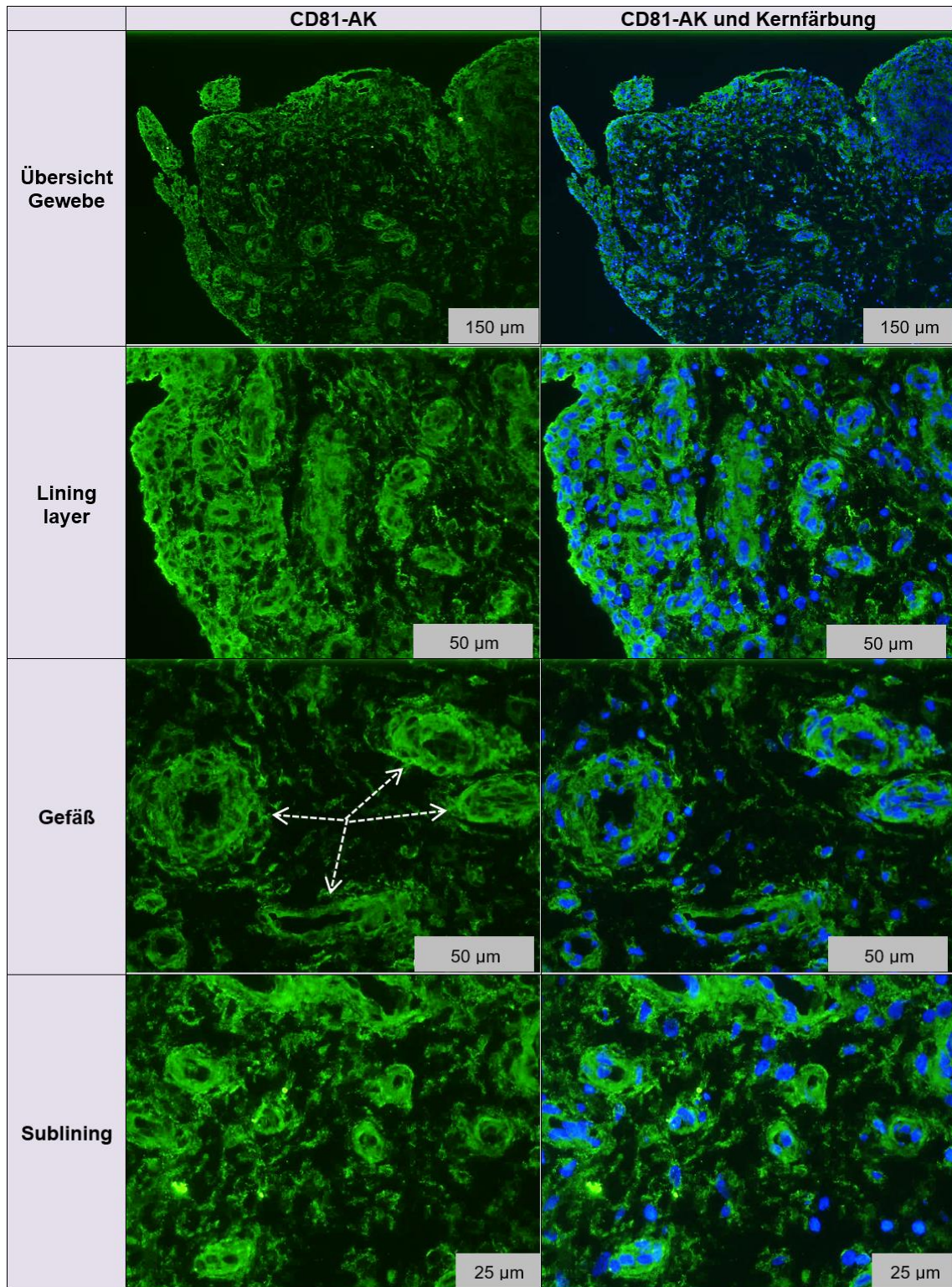
Eine verhältnismäßig stärkere Färbung des Endothels der Gefäße im Vergleich zu Media und Adventitia zeigte sich nur vereinzelt in wenigen RA-Gewebe und betraf dort nur wenige Bereiche oder einzelne Gefäße. In OA-Gewebe konnte eine solche Färbung nicht beobachtet werden.

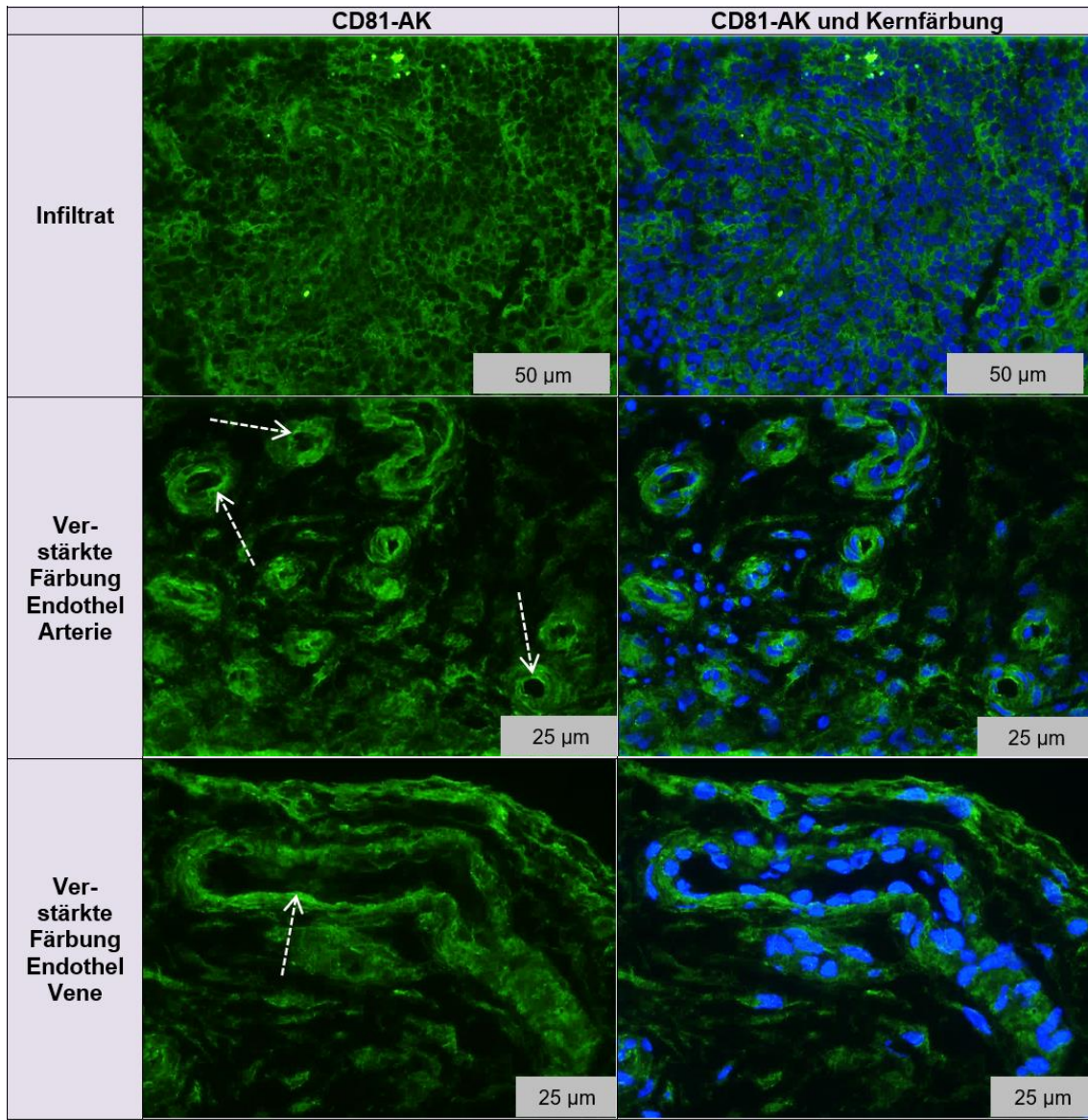
Generell fiel auf, dass die Färbung des CD81-AKs, im Gegensatz zu den anderen Tetraspaninen, den Zellkernbereich aussparte.



**Abb. 13: Durchschnittliche Score-Werte der Immunfluoreszenz-Auswertungskategorien für CD81**

Dargestellt sind für jede Kategorie, welche bei der Immunfluoreszenz-Färbung unter Verwendung des CD81-Antikörpers bewertet wurde, die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Score-Werte für OA (blau) bzw. RA (rot). Die Anzahl der für jede Kategorie bewerteten Gewebe ist als Stichprobenumfang (n) dargestellt. Score-Werte sind definiert als „Kategorie/ Areal nicht vorhanden“ (-), „keine Färbung/ nichtzutreffend“ (0), „wenige Bereiche oder einzelne Zellen gefärbt/ bei einzelnen Gefäßen zutreffend“ (1), „mittelstarke Färbung, die mindestens die Hälfte der Probe betrifft/ für mindestens die Hälfte der Gefäße zutreffend“ (2) und „der Großteil der Probe ist mittel bis stark gefärbt/ für den Großteil der Gefäße zutreffend“ (3).





**Abb. 14: Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbung eines Gewebes für CD81**

Die Abbildung zeigt ein Gewebe, welches das Ergebnis der Immunfluoreszenz-Färbung zum Tetraspanin CD81 repräsentativ darstellt. Zellen des *lining layer*, der Gefäße (s. Pfeile) und des *sublinings* zeigen im gesamten Gewebe ein starkes Signal des CD81-Antikörpers (grün fluoreszierend). Zellkerne sind blau fluoreszierend. Auch ein in diesem Gewebe enthaltenes Infiltrat weist ein starkes Signal aller Zellen auf. Nicht repräsentativ für das Gesamtergebnis der CD81-Immunfluoreszenz-Färbung, aber in diesem Gewebe ebenfalls auffällig, ist eine verhältnismäßig verstärkte Färbung des Endothels im Vergleich zur Media und Adventitia bei Arterien und einer Vene (s. Pfeile). Bei der Färbung von CD81 auffallend ist die Aussparung des Signals im Zellkernbereich.

**Tab. 37: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Signale für CD81 in den Grundkategorien für alle OA- und RA-Gewebe**

Score-Werte sind definiert als „Kategorie/ Areal nicht vorhanden“ (-), „keine Färbung/nichtzutreffend“ (0), „wenige Bereiche oder einzelne Zellen gefärbt“ (1), „mittelstarke Färbung, die mindestens die Hälfte der Probe betrifft“ (2) und „der Großteil der Probe ist mittel bis stark gefärbt“ (3).

| Gewebeprobe | Lining layer | Gefäße         |                   | Sublining |            |
|-------------|--------------|----------------|-------------------|-----------|------------|
|             |              | Endothelzellen | Media, Adventitia | Zellen    | Infiltrate |
| OA          | OA358 Syn7   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | OA379 Syn5   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | OA382 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA391 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA393 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA398 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | OA413 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | OA415 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA417 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA418 Syn2   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA419 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA425 Syn4   | 2              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA476 Syn3   | 3              | 2                 | 3         | 3          |
|             | OABN93 Syn4  | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OABN95 Syn4  | 3              | 3                 | 3         | -          |
| <b>n</b>    | <b>15</b>    | <b>15</b>      | <b>15</b>         | <b>15</b> | <b>5</b>   |
| RA          | RA375 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA376 Syn2   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA382 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA384 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | RA385 Syn2   | 3              | 3                 | -         | 3          |
|             | RA386 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA389 Syn2   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA391 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA397 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA402 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA406 Syn4   | 2              | 3                 | 3         | 2          |
|             | RA419 Syn2   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | RA421 Syn3   | 2              | 3                 | 3         | 3          |
|             | RA434 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
| RABN23 Syn3 | 1            | 3              | 3                 | 3         |            |
| <b>n</b>    | <b>15</b>    | <b>15</b>      | <b>14</b>         | <b>15</b> | <b>5</b>   |

**Tab. 38: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Signale für CD81 in den Spezialkategorien für alle OA- und RA-Gewebe**

Score-Werte sind definiert als „Kategorie/ Areal nicht vorhanden“ (-), „nichtzutreffend“ (0), „bei einzelnen Gefäßen zutreffend“ (1), „für mindestens die Hälfte der Gefäße zutreffend“ (2) und „für den Großteil der Gefäße zutreffend“ (3).

| Gewebeprobe |             | verstärkte Färbung des Endothels im Vergleich zur Media/Adventitia |          |                        |
|-------------|-------------|--|----------|------------------------|
|             |             | Arterie  | Vene     | Färbung ohne Zuordnung |
| OA          | OA358 Syn7  | 0  | 0        |                        |
|             | OA379 Syn5  | 0  | 0        |                        |
|             | OA382 Syn3  | 0  | 0        |                        |
|             | OA391 Syn4  | 0  | 0        |                        |
|             | OA393 Syn4  | 0  | 0        |                        |
|             | OA398 Syn4  | 0  | 0        |                        |
|             | OA413 Syn3  | 0  | 0        |                        |
|             | OA415 Syn4  | 0  | 0        |                        |
|             | OA417 Syn4  | 0  | 0        |                        |
|             | OA418 Syn2  | 0  | 0        |                        |
|             | OA419 Syn3  | 0  | 0        |                        |
|             | OA425 Syn4  | 0  | 0        |                        |
|             | OA476 Syn3  | 0  | 0        |                        |
|             | OABN93 Syn4 | 0  | 0        |                        |
|             | OABN95 Syn4 |  |          | 1                      |
| <b>n</b>    | <b>14</b>   | <b>14</b>  | <b>1</b> |                        |
| RA          | RA375 Syn3  | 0  | 0        |                        |
|             | RA376 Syn2  | 0  | 0        |                        |
|             | RA382 Syn3  | 0  | 0        |                        |
|             | RA384 Syn4  | 0  | 0        |                        |
|             | RA385 Syn2  | 0  | 0        |                        |
|             | RA386 Syn4  | 0  | 0        |                        |
|             | RA389 Syn2  | 0  | 0        |                        |
|             | RA391 Syn3  | 2  | 2        |                        |
|             | RA397 Syn3  | 0  | 0        |                        |
|             | RA402 Syn4  | 1  | 1        |                        |
|             | RA406 Syn4  | 0  | 0        |                        |
|             | RA419 Syn2  | 0  | 0        |                        |
|             | RA421 Syn3  | 2  | 1        |                        |
|             | RA434 Syn4  | 0  | 0        |                        |
| RABN23 Syn3 | 0           | 0  |          |                        |
| <b>n</b>    | <b>15</b>   | <b>15</b>  | <b>0</b> |                        |

Die etablierte IF-Färbung für den CD81-AK führte im Rahmen einer Kooperation mit einer Arbeitsgruppe des Biomedizinischen Forschungszentrums Seltersberg in Gießen zur Bereitstellung einer Positivkontrolle in Form einer IF-Färbung des CD81-AKs auf einem OA-Gewebe. Von der Arbeitsgruppe des Biomedizinischen Forschungszentrums Seltersberg wurde mittels IF die CD81-Expression in THP1-Zellen nach Behandlung mit Exosomen untersucht.

### 4.1.3 Etablierung zum Tetraspanin CD151

#### 4.1.3.1 Etablierung der Immunhistochemie

Die zur Orientierung durchgeführte Immunfluoreszenz-Färbung nach CD82-Protokoll (s. Kapitel 4.1.1) mit den Verdünnungen 1:100 und 1:500 (vom Hersteller empfohlener Verdünnungsbereich) für den polyklonalen Primärantikörper gegen CD151 (bioby) lieferte auch bei diesem Tetraspanin unspezifische Signale in der Isotypkontrolle und kaum Signale des CD151-AKs, welche sich vom Hintergrund abhoben. So wurde auch bei CD151 zunächst mit der Etablierung der Immunhistochemie fortgefahren. Das Basisprotokoll der IHC ist unter Kapitel 3.2 beschrieben. Der erste Etablierungsschritt auf RA-Gewebe mit einem monoklonalen, in Kaninchen generierten, anti-humanen Isotyp (abcam) sowie dem polyklonalen Primärantikörper gegen CD151 (1:300 in PBS) ergab unspezifische Signale in der Negativkontrolle, Isotypkontrolle sowie für den CD151-AK selbst. Es folgten neben dem Wechsel zu einem polyklonalen, in Kaninchen generierten, anti-humanen Isotyp (bioby) weitere Variationen des Blockens, die jedoch keine optimale Färbung erzielten (s. Tab. 39). Verschiedene Variationen, wie die Erhöhung der Konzentration des CD151-AKs und die Verwendung verschiedener Kontrollgewebe mit bekannter CD151-Expression, führten nicht zur erfolgreichen Etablierung des verwendeten Antikörpers (s. Tab. 39).

Es traten die bereits bei der Etablierung des CD63-AKs beschriebene Problematiken beim Färben der bei -20 °C gelagerten seriellen Gewebeschnitte auf. Analog zu der Vorgehensweise beim CD63-AK erfolgte auch der Nachweis von CD151 in je 15 RA- und OA-Geweben per Immunfluoreszenz.

**Tab. 39: Getestete Varianten des Immunhistochemie-Protokolls für CD151**  
(NK (Negativkontrolle), Iso (Isotypkontrolle), AK (CD151-Antikörper))

| Blocken         | CD151-AK         | Gewebe | Entwicklung | Ergebnis Signal  |
|-----------------|------------------|--------|-------------|--|
| 2 % BSA         | 1:300 in PBS     | RA     | 3 min       | NK, Iso: unspezifisch<br>AK: spezifisches Signal             |
| 5 % BSA         | 1:300 in PBS     | RA     | 2 min       | NK, Iso: Signal<br>AK: starkes Signal                        |
| 10 % BSA        | 1:300 in PBS     | RA     | 2 min       | NK, Iso: kein Signal / Signal<br>AK: starkes Signal          |
| 10 % BSA-Mix    | 1:300 in PBS     | RA     | 2 min       | NK, Iso: Signal / stark<br>AK: starkes Signal                |
| 5 % Milchpulver | 1:300 in PBS     | RA     | 2 min       | NK, Iso: Signal / stark<br>AK: starkes Signal                |
| 5 % BSA         | 1:300 in 5 % BSA | RA     | 2 min       | NK, Iso: keins/ schwach<br>AK: starkes Signal                |
| 5 % BSA         | 1:300 in PBS     | RA     | 2 min       | NK, Iso: kein Signal / stark<br>AK: zelluläres Signal, stark |

Ergebnisse

| Blocken             | CD151-AK                    | Gewebe | Entwicklung   | Ergebnis Signal  |
|---------------------|-----------------------------|--------|---------------|--|
| 10 % BSA            | 1:300 in PBS                | RA     | 2 min         | NK, Iso: keins / zellulär, stark<br>AK: starkes Signal wie Iso |
| 10 % BSA-Mix        | 1:300 in PBS                | RA     | 2 min         | NK, Iso: schwach / zellulär<br>AK: starkes Signal              |
| 5 % Milchpulver     | 1:300 in PBS                | RA     | 3 min         | NK, Iso: schwach / zellulär<br>AK: zelluläres Signal, stark    |
| 5 % BSA             | 1:300 in 5 % BSA            | RA     | 2 min         | NK, Iso: schwach / stark<br>AK: sehr starkes Signal            |
| 10 % BSA            | 1:300 in<br>10 % BSA        | RA     | 3 min         | NK, Iso: schwaches / zellulär<br>AK: zelluläres Signal, stark  |
| 10 % BSA            | 1:300 in 5 % BSA            | RA     | 3 min         | NK, Iso: keins / zellulär<br>AK: zelluläres Signal, stark      |
| 5 % Serum Kaninchen | 1:300 in PBS                | RA     | 4 min         | NK, Iso: graues Signal, stark<br>AK: graues Signal, stark      |
| 5 % Serum Ziege     | 1:300 in PBS                | RA     | 4 min         | NK, Iso: keins / sehr schwach<br>AK: schwaches Signal          |
| 5 % Milchpulver     | 1:300 in<br>5 % Milchpulver | RA     | 4 min         | NK, Iso: keins / schwach<br>AK: zelluläres Signal, stark       |
| 5 % Milchpulver     | 1:300 in<br>5 % Milchpulver | OA/RA  | 6-7 min       | NK, Iso: kein Signal<br>AK: starkes Signal                     |
| 5 % Milchpulver     | 1:400 in<br>5 % Milchpulver | OA/RA  | 12-<br>14 min | Iso: schwach bis keins<br>AK: schwaches Signal                 |
| 5 % BSA             | 1:300 in PBS                | Lunge  | 7 min         | NK, Iso: kein Signal<br>AK: sehr schwaches Signal              |
| 5 % BSA             | 1:300 in PBS                | OA, RA | 7 min         | NK, Iso: keins / schwach<br>AK: starkes Signal                 |
| 5 % BSA             | 1:300 in PBS                | RA     | 2 min         | NK, Iso: keins / grau<br>AK: starkes Signal                    |
| 5 % BSA             | 1:300 in 5 % BSA            | RA     | 1,5 min       | NK, Iso: kein Signal<br>AK: starkes Signal                     |
| 10 % BSA            | 1:300 in PBS                | RA     | 1,5 min       | NK, Iso: keins / schwach<br>AK: starkes Signal                 |
| 10 % BSA            | 1:300 in 5 % BSA            | RA     | 1,5 min       | NK, Iso: kein Signal<br>AK: starkes Signal                     |
| 10 % BSA            | 1:300 in<br>10 % BSA        | RA     | 2 min         | NK, Iso: keins / schwach<br>AK: starkes Signal                 |
| 10 % BSA-Mix        | 1:300 in PBS                | RA     | 1,5 min       | NK, Iso: kein Signal<br>AK: starkes Signal                     |
| 10 % BSA-Mix        | 1:300 in 5 % BSA            | RA     | 2 min         | NK, Iso: kein Signal<br>AK: schwächeres Signal                 |
| 10 % BSA-Mix        | 1:300 in<br>10 % BSA        | RA     | 1,5 min       | NK, Iso: kein Signal<br>AK: starkes Signal                     |
| 5 % Milchpulver     | 1:300 in PBS                | RA     | 3 min         | NK, Iso: keins / schwach<br>AK: schwächeres Signal             |
| 5 % Milchpulver     | 1:300 in<br>5 % Milchpulver | RA     | 5 min         | NK, Iso: keins / schwach<br>AK: schwächeres Signal             |
| 5 % Milchpulver     | 1:300 in PBS                | OA/RA  | 6/10 min      | NK, Iso: kein Signal<br>AK: keins / schwach / stark            |
| 5 % Milchpulver     | 1:450 in PBS                | OA/RA  | 6/10 min      | AK: schwach / stark  |

#### **4.1.3.2 Etablierung der Immunfluoreszenz**

Die Immunfluoreszenz-Färbung wurde anhand eines etablierten IF-Basisprotokolls (s. Kapitel 3.3) unter der Verwendung eines Blocks mit 5 % Milchpulver, einer polyklonalen, in Kaninchen generierten, anti-humanen Isotypkontrolle (biorbyt, 1:900 in PBS) sowie dem polyklonalen Antikörper gegen CD151 (bioby, 1:450 in PBS) durchgeführt. Für den Fluoreszenznachweis wurden verschiedene Sekundär-AK erprobt. Die polyklonalen Antikörper Dylight 649 (BioLegend, in Esel generiert, Anti-Kaninchen), Cy3 (Jackson-ImmunoResearch, in Ziege generiert, Anti-Kaninchen) sowie der grün fluoreszierende, in Ziege generierte Anti-Kaninchen-Antikörper FITC (abcam) wurden verglichen und unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Der Sekundär-AK Cy3 mit einer Konzentration von 1:250 zeigte ein gutes, reproduzierbares Signal und wurde in das etablierte Protokoll der Immunfluoreszenz von CD151 aufgenommen (s. Kapitel 3.3 und Tab. 24).

Bei der Anwendung des etablierten Protokolls auf verschiedenen Geweben traten Problematiken durch Fehlen von Signalen des CD151-AKs auf. Diese wurden vermutlich durch eine Schädigung des Antikörpers durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren verursacht. Lagerung und Verwendung des Antikörpers wurden daraufhin angepasst. Es folgten die Immunfluoreszenz-Färbungen für die Auswertung auf allen 15 OA- und 15 RA-Geweben. Alle OA- und alle RA-Gewebe wurden jeweils in einem IF-Durchlauf angesetzt und jeweils eine Isotypkontrolle mitgeführt. Die Färbungen ergaben spezifische Signale des CD151-AKs, jedoch waren diese sehr schwach ausgebildet. Die beiden Immunfluoreszenz-Ansätze wurden noch einmal wiederholt, wobei darauf geachtet wurde, dass 100 statt 50 µl des Primär-AKs pro Schnitt aufgetragen wurden. Dies lieferte bessere Ergebnisse, sodass die Färbungen zur Auswertung verwendet werden konnten. Sie wurden mittels Mikroskops und digitaler Kamera in verschiedenen Vergrößerungen fotografisch dokumentiert.

#### **4.1.3.3 Auswertung der Immunfluoreszenzsignale von CD151**

Die Immunfluoreszenz-Färbung von CD151 auf 15 OA- und 15 RA-Gewebeproben wurden anhand des in den Methoden beschriebenen Scores zur Auswertung der IF-Färbungen (s. Kapitel 3.10.1.3) und den dazugehörigen Umgebungsbedingungen ausgewertet. Repräsentative Bilder sind in Abb. 16 und Abb. 17 dargestellt. Hierbei lag der Fokus auf der Verteilung der AK-Signale, während die Intensität der Signale in einem späteren Kapitel mittels eigenen Scores gesondert betrachtet wird (s. Kapitel 4.1.6). Die Ergebnisse sind in Tab. 40 dargestellt. Wie auch bei den anderen Tetraspaninen konnten bei den Gefäßen generell keine Unterschiede zwischen arteriellem und venösem Gefäß

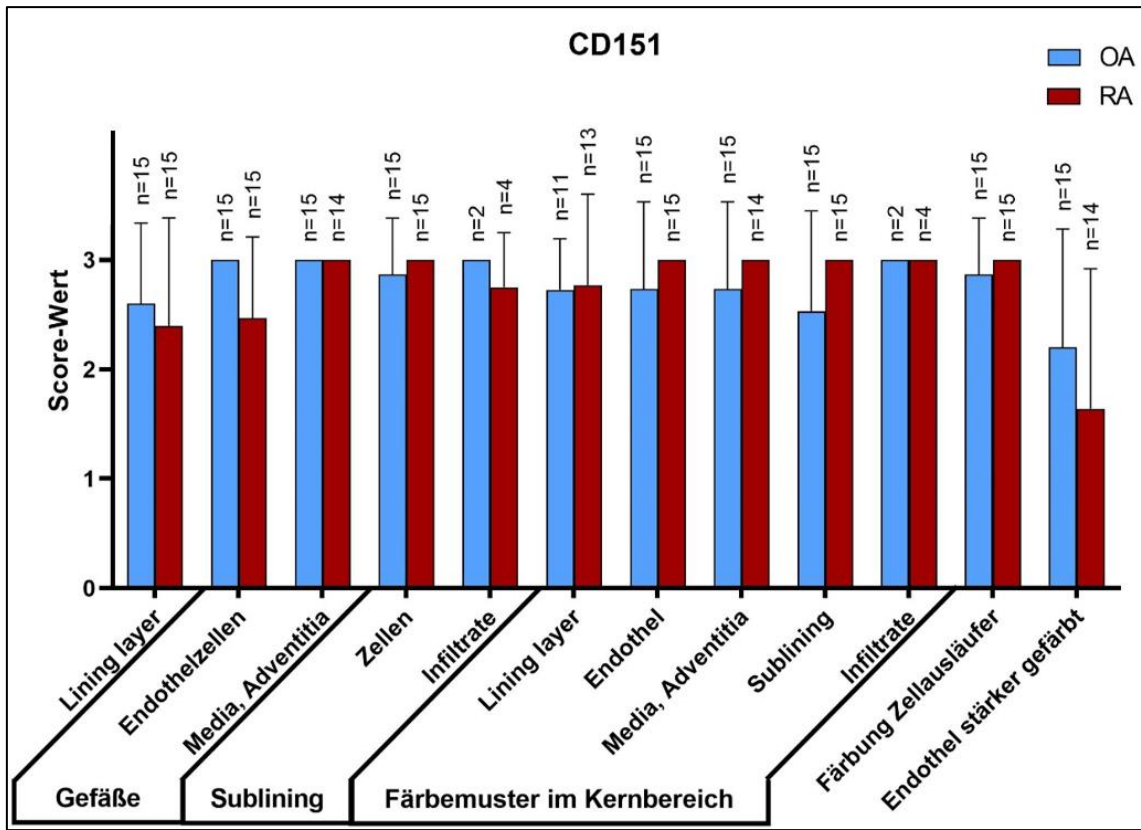
bezüglich der Färbung festgestellt werden (nicht in Tab. 40 dargestellt).

Während der Auswertung des Tetraspanins CD151 ließ sich ein spezielles Färbemuster im Bereich des Zellkerns beobachten. Außerdem fiel eine vergleichsweise starke Färbung der Fibroblasten-ähnlichen Zellausläufer auf. Teilweise waren bei den Gefäßen auch das Endothel und die Adventitia stärker gefärbt als die Media (vgl. Kapitel 3.10.1.3 und Abb. 9). Um dies genauer zu untersuchen und zu quantifizieren, wurden diese Merkmale ebenfalls mittels des Scores zur Auswertung der IF-Färbungen ausgewertet (s. Tab. 41). Betrachtet wurde dabei nur die größte Vergrößerung (400x).

Der Datensatz der Score-Ergebnisse zu Grund- und Spezialkategorien wurde graphisch ausgewertet (s. Abb. 15). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen OA und RA innerhalb der einzelnen Kategorien.

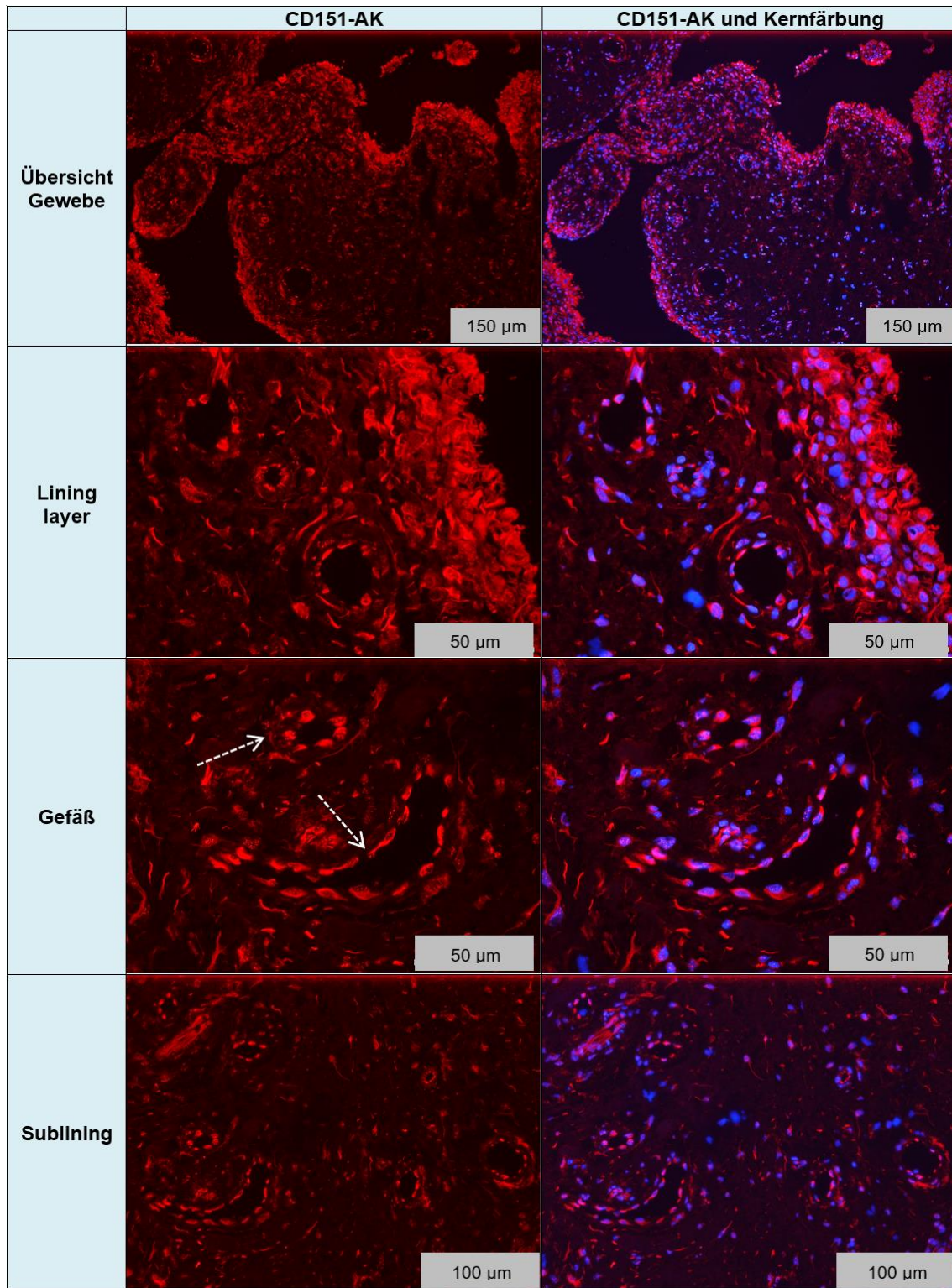
Wurde das arithmetische Mittel der in die Kategorien eingeschlossenen Gewebe betrachtet, zeigte sich im Mittel eine eher starke Färbung im gesamten Gewebe für die Areale *lining layer*, Gefäße und *sublining*. Dabei wiesen die OA-Gewebe im *lining layer* und die RA-Gewebe in *lining layer* sowie den Endothelzellen der Gefäße im Durchschnitt einen etwas geringeren Score-Wert zwischen starker und mittelstarker Färbung auf. Somit ergab sich ein geringer Unterschied zwischen OA- und RA-Gewebe bei Endothelzellen. Infiltrate konnten auch bei CD151 sowohl bei OA- als auch bei RA-Gewebe nur in wenigen Proben gefunden werden (n=2 und n=4).

Im Hinblick auf die Spezialkategorie des Färbemusters im Bereich der Zellkerne zeigte sich ein solches als starke Färbung im gesamten Gewebe in Zellen von *lining layer*, Gefäßen und *sublining*. Eine durchschnittlich starke Färbung der Zellausläufer von Zellen des *sublinings* ließ sich ebenfalls im gesamten Gewebe verzeichnen. Eine verhältnismäßig verstärkte Färbung im Endothel der Gefäße im Vergleich zu Media und Adventitia betraf durchschnittlich nur etwa die Hälfte der Gefäße im Gewebe. RA-Gewebe zeigten hierbei eine etwas geringere Ausprägung der Färbung als OA-Gewebe.



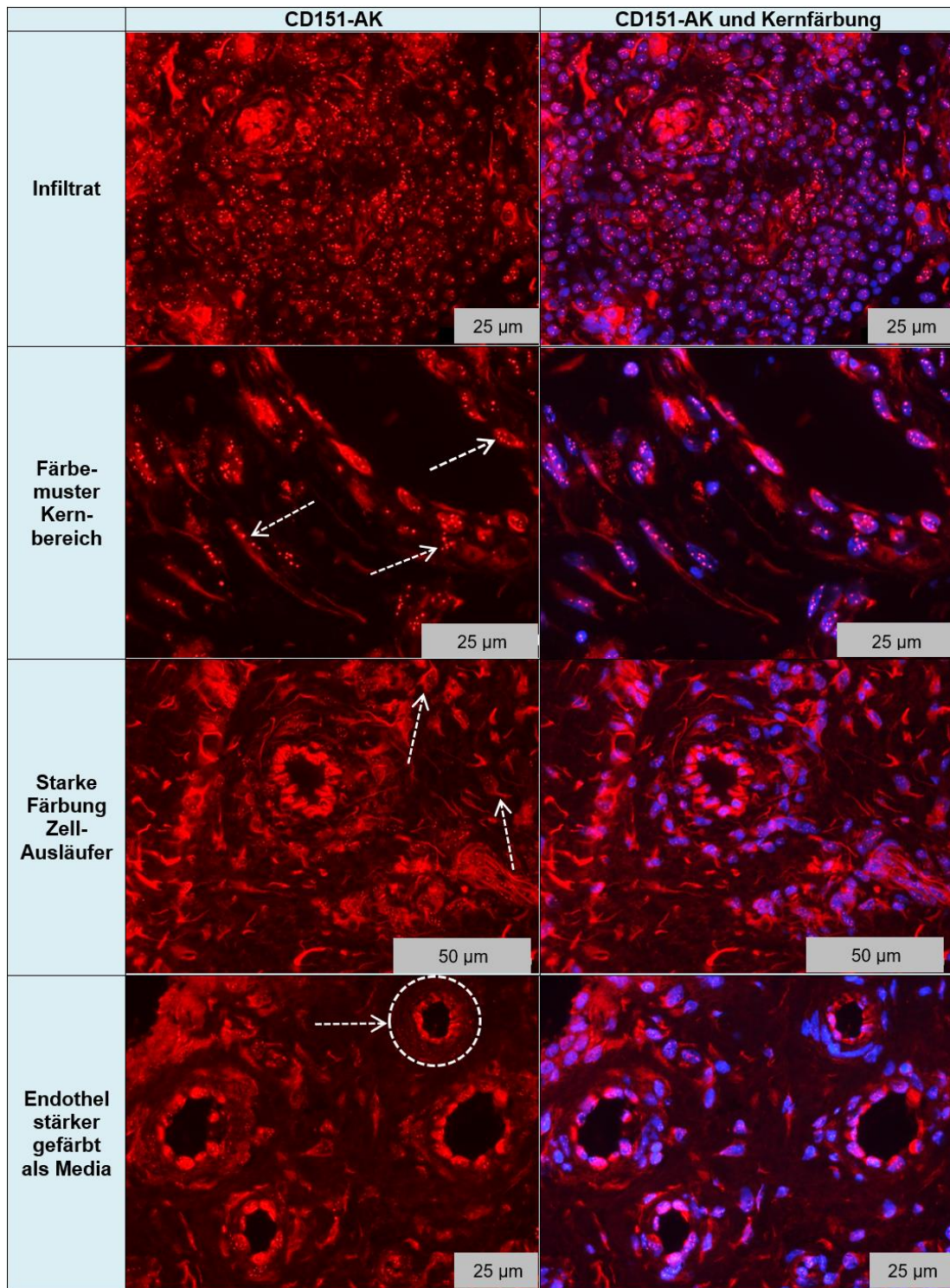
**Abb. 15: Durchschnittliche Score-Werte der Immunfluoreszenz-Auswertungskategorien für CD151**

Dargestellt sind für jede Kategorie, welche bei der Immunfluoreszenz-Färbung unter Verwendung des CD151-Antikörpers bewertet wurde, die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Score-Werte für OA (blau) bzw. RA (rot). Die Anzahl der für jede Kategorie bewerteten Gewebe ist als Stichprobenumfang (n) dargestellt. Score-Werte sind definiert als „Kategorie/ Areal nicht vorhanden“ (-), „keine Färbung/ nichtzutreffend“ (0), „wenige Bereiche oder einzelne Zellen gefärbt/ bei einzelnen Gefäßen zutreffend“ (1), „mittelstarke Färbung, die mindestens die Hälfte der Probe betrifft/ für mindestens die Hälfte der Gefäße zutreffend“ (2) und „der Großteil der Probe ist mittel bis stark gefärbt/ für den Großteil der Gefäße zutreffend“ (3).



**Abb. 16: Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbung eines Gewebes für CD151 (Teil 1)**

Die Abbildung zeigt ein Gewebe, welches das Ergebnis der Immunfluoreszenz-Färbung zum Tetraspanin CD151 repräsentativ darstellt. Zellen des *lining layer*, der Gefäße (s. Pfeile) und des *sublinings* zeigen für das gesamte Gewebe ein starkes Signal des CD151-Antikörpers (rot fluoreszierend). Zellkerne sind blau fluoreszierend.



**Abb. 17: Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbung eines Gewebes für CD151 (Teil 2)**  
 Dargestellt ist ein Infiltrat, welches ein starkes Signal des CD151-Antikörpers (rot) sowie ein auffälliges Färbemuster im Kern (blau) aller Zellen aufweist. Das auffällige Färbemuster im Bereich der Zellkerne betrifft außerdem sowohl Zellen in Endothel und Media / Adventitia von Gefäßen, als auch Zellen des *sublinings* (mit Pfeilen markiert). Auch in Zellen des *lining layers* lässt sich eine solche Färbung beobachten (hier nicht dargestellt). Weiterhin gezeigt, ist die starke Färbung von Zellausläufern der Zellen im *sublining*, welche in ihrer Form an Fibroblasten erinnern (s. Pfeile). Nicht repräsentativ für das Gesamtergebnis der CD151-Immunfluoreszenz-Färbung, aber in dem dargestellten Gewebe stark aufgeprägt, ist eine verhältnismäßig verstärkte Färbung des Endothels im Vergleich zu Media und Adventitia bei Gefäßen (beispielhaft mit Kreis markiert).

**Tab. 40: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Signale für CD151 in den Grundkategorien für alle OA- und RA-Gewebe**

Score-Werte sind definiert als „Kategorie/ Areal nicht vorhanden“ (-), „keine Färbung/nichtzutreffend“ (0), „wenige Bereiche oder einzelne Zellen gefärbt“ (1), „mittelstarke Färbung, die mindestens die Hälfte der Probe betrifft“ (2) und „der Großteil der Probe ist mittel bis stark gefärbt“ (3).

| Gewebeprobe | Lining layer | Gefäße         |                   | Sublining |            |
|-------------|--------------|----------------|-------------------|-----------|------------|
|             |              | Endothelzellen | Media, Adventitia | Zellen    | Infiltrate |
| OA          | OA358 Syn7   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | OA379 Syn5   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | OA382 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA391 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA393 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA398 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA413 Syn3   | 2              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA415 Syn4   | 1              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA417 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA418 Syn2   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA419 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA425 Syn4   | 1              | 3                 | 3         | -          |
|             | OA476 Syn3   | 2              | 3                 | 3         | 1          |
|             | OABN93 Syn4  | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | OABN95 Syn4  | 3              | 3                 | 3         | 3          |
| <b>n</b>    | <b>15</b>    | <b>15</b>      | <b>15</b>         | <b>15</b> | <b>2</b>   |
| RA          | RA375 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA376 Syn2   | 3              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA382 Syn3   | 2              | 3                 | 3         | -          |
|             | RA384 Syn4   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | RA385 Syn2   | 3              | 3                 | -         | 3          |
|             | RA386 Syn4   | 2              | 3                 | 3         | 3          |
|             | RA389 Syn2   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | RA391 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | RA397 Syn3   | 3              | 3                 | 3         | 3          |
|             | RA402 Syn4   | 1              | 1                 | 3         | 3          |
|             | RA406 Syn4   | 0              | 1                 | 3         | 3          |
|             | RA419 Syn2   | 3              | 2                 | 3         | 3          |
|             | RA421 Syn3   | 3              | 2                 | 3         | 3          |
|             | RA434 Syn4   | 3              | 2                 | 3         | 3          |
|             | RABN23 Syn3  | 1              | 2                 | 3         | 3          |
| <b>n</b>    | <b>15</b>    | <b>15</b>      | <b>14</b>         | <b>15</b> | <b>4</b>   |

**Tab. 41: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Signale für CD151 in den Spezialkategorien für alle OA- und RA-Gewebe**

Score-Werte sind definiert als „Kategorie/ Areal nicht vorhanden“ (-), „keine Färbung/ nichtzutreffend“ (0), „wenige Bereiche oder einzelne Zellen gefärbt/ bei einzelnen Gefäßen zutreffend“ (1), „mittelstarke Färbung, die mindestens die Hälfte der Probe betrifft/ für mindestens die Hälfte der Gefäße zutreffend“ (2) und „der Großteil der Probe ist mittel bis stark gefärbt/ für den Großteil der Gefäße zutreffend“ (3).

| Gewebeprobe | spezielles Färbemuster im Zellkernbereich |           |                   |            |            | starke Färbung Fibroblasten (FB)-ähnlicher Zellausläufer | Endothel (und Adventitia) stärker gefärbt als Media |
|-------------|---|-----------|-------------------|------------|------------|--|---|
|             | Lining layer                              | Endothel  | Media, Adventitia | Sub-lining | Infiltrate |  |   |
| OA          | OA358 Syn7                                | 2         | 3                 | 3          | 3          | 3  | 3   |
|             | OA379 Syn5                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | 3  | 3   |
|             | OA382 Syn3                                | 2         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | OA391 Syn4                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | OA393 Syn4                                | 3         | 3                 | 3          | 2          | -  | 1   |
|             | OA398 Syn4                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | OA413 Syn3                                | -         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | OA415 Syn4                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | OA417 Syn4                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | OA418 Syn2                                | -         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | OA419 Syn3                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | OA425 Syn4                                | -         | 3                 | 3          | 1          | -  | 3   |
|             | OA476 Syn3                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | OABN93 Syn4                               | -         | 0                 | 0          | 0          | -  | 3   |
|             | OABN95 Syn4                               | 2         | 2                 | 2          | 2          | -  | 3   |
| <b>n</b>    | <b>11</b>                                 | <b>15</b> | <b>15</b>         | <b>15</b>  | <b>2</b>   | <b>15</b>  | <b>15</b>   |
| RA          | RA375 Syn3                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | RA376 Syn2                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | RA382 Syn3                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | RA384 Syn4                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | 3  | 3   |
|             | RA385 Syn2                                | 3         | 3                 | -          | 3          | -  | 3   |
|             | RA386 Syn4                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | RA389 Syn2                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | RA391 Syn3                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | RA397 Syn3                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | RA402 Syn4                                | -         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | RA406 Syn4                                | -         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | RA419 Syn2                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | 3  | 3   |
|             | RA421 Syn3                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | -  | 3   |
|             | RA434 Syn4                                | 3         | 3                 | 3          | 3          | 3  | 3   |
|             | RABN23 Syn3                               | 0         | 3                 | 3          | 3          | 3  | 3   |
| <b>n</b>    | <b>13</b>                                 | <b>15</b> | <b>14</b>         | <b>15</b>  | <b>4</b>   | <b>15</b>  | <b>14</b>   |

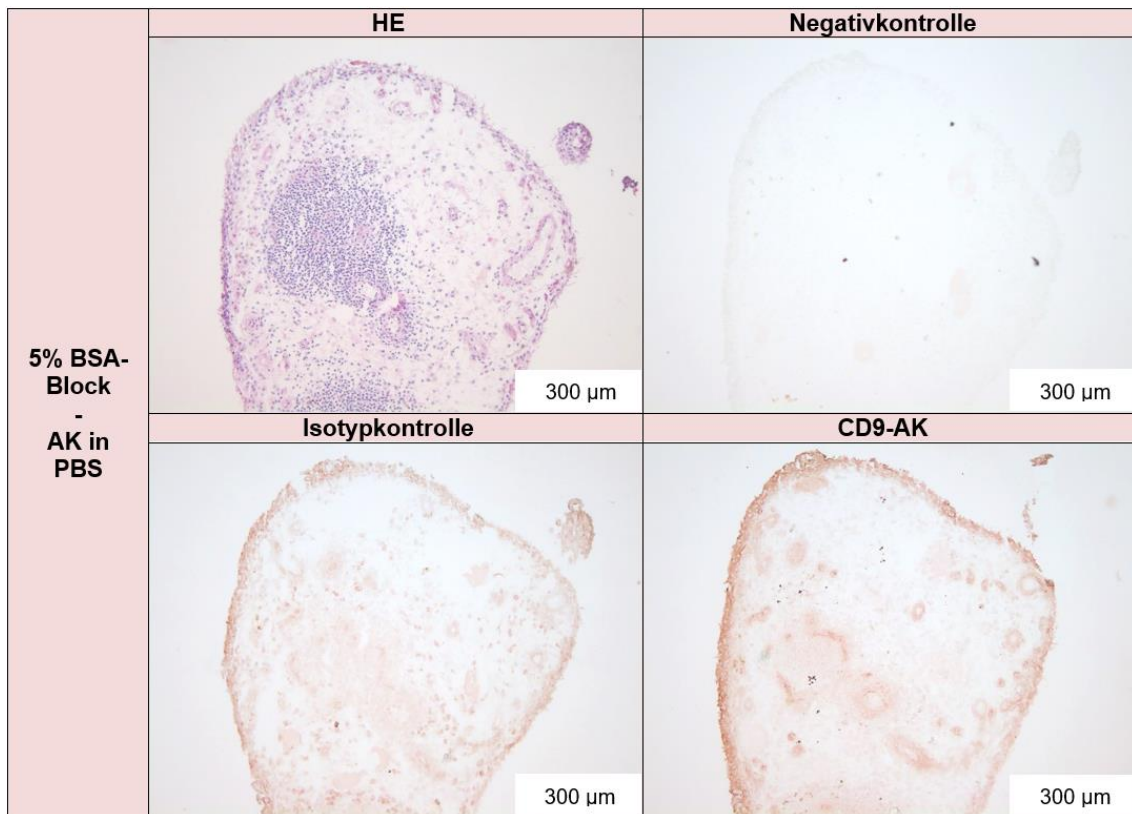
#### **4.1.4 Etablierung zum Tetraspanin CD9**

Wie bei den anderen Tetraspaninen ergab die zu Beginn der Etablierung durchgeführte Immunfluoreszenz-Färbung nach CD82-Protokoll (s. Kapitel 4.1.1) für CD9 unspezifische Signale in der Isotypkontrolle sowie des polyklonalen Kaninchen-anti-humanen CD9-Primär-AKs (biobyte), welche sich kaum vom Hintergrund abhoben. Für den CD9-AK wurden die Konzentrationen 1:100 und 1:500 verwendet, welche den Empfehlungen des Herstellers entsprachen. Die Etablierung wurde auch für CD9 zunächst mit einer Immunhistochemie fortgeführt. Das Basisprotokoll der IHC ist unter Kapitel 3.2 beschrieben. Es wurde ein monoklonaler, Kaninchen-anti-humaner Isotyp (abcam), der CD9-AK (1:150 in PBS) sowie der polyklonale, Ziege-anti-Kaninchen-Sekundär-AK (BD Pharmingen, 1:200 in PBS) verwendet. Bereits nach einer Entwicklungszeit von zwei Minuten zeigten sich unspezifische Signale in der Negativkontrolle und Isotypkontrolle, aber auch ein Signal des CD9-AKs. Aufgrund des nicht optimalen Blockings und einer möglichen Problematik im sekundären Nachweissystem wurden verschiedene Variablen überprüft, die in Tab. 42 zusammengestellt wurden.

**Tab. 42: Getestete Varianten des Immunhistochemie-Protokolls für CD9**  
(NK (Negativkontrolle), Iso (Isotypkontrolle), AK (CD9-Antikörper))

| Blocken              | CD9-AK                   | Gewebe           | Entwicklung | Ergebnis Signal  |
|----------------------|--------------------------|------------------|-------------|--|
| 2 % BSA              | 1:150 in PBS             | RA               | 2 min       | NK, Iso: unspezifisch<br>AK: spezifisches Signal             |
| 5 % Serum Ziege      | 1:150 in PBS             | RA               | 3 min       | Iso: zelluläres Signal, stark<br>AK: schwaches Signal        |
| 5 % Milchpulver      | 1:150 in PBS             | RA               | 4 min       | Iso: zelluläres Signal, stark<br>AK: nicht-zelluläres Signal |
| 5 % Milchpulver      | 1:150 in 5 % Milchpulver | RA               | 4 min       | Iso: zelluläres Signal, stark<br>AK: kaum Signal             |
| 10 % BSA             | 1:150 in PBS             | OA               | 3 min       | Iso: zelluläres Signal, stark<br>AK: starkes Signal          |
| 5 % BSA              | 1:150 in 5 % BSA         | OA               | 2 min       | Iso: unspezifische Signale<br>AK: starkes Signal             |
| 5 % BSA              | 1:150 in PBS             | OA               | 2 min       | Iso: zelluläres Signal, stark<br>AK: starke Signale          |
| 5 % BSA              | 1:300 in PBS             | OA               | 2 min       | Iso: kaum Signal<br>AK: braunes Signal                       |
| 10 % BSA             | 1:150 in 10 % BSA        | OA               | 2 min       | Iso: starkes Signal<br>AK: starkes Signal                    |
| 10 % BSA             | 1:150 in 5 % BSA         | OA               | 2 min       | Iso: starkes Signal<br>AK: braunes Signal                    |
| 5 % BSA<br>Ü/N 4 °C  | 1:150 in 5 % BSA         | OA               | 4 min       | Iso: sehr starkes Signal<br>AK: starkes Signal               |
| 10 % BSA<br>Ü/N 4 °C | 1:150 in 5 % BSA         | OA               | 4 min       | Iso: starkes Signal<br>AK: Signal                            |
| 5 % BSA              | 1:300 in 5 % BSA         | RA               | 2 min       | Iso: starkes Signal<br>AK: braunes Signal                    |
| 10 % BSA             | 1:300 in PBS             | RA               | 2 min       | Iso: zelluläres Signal, stark<br>AK: variabel Signal         |
| 5 % BSA              | 1:600 in PBS             | RA               | 3 min       | Iso: schwach zellulär<br>AK: Signal nur im LL                |
| 5 % BSA              | 1:600 in 5 % BSA         | RA               | 2 min       | Iso: zelluläres Signal, stark<br>AK: Signal im LL            |
| 10 % BSA             | 1:600 in PBS             | RA               | 3 min       | Iso: schwach zellulär<br>AK: kaum Signal                     |
| 5 % BSA              | 1:150 in PBS             | Lunge,<br>Colon  | 2 min       | Iso: schwach / stark<br>AK: braun / schwach                  |
| 5 % BSA              | 1:150 in PBS             | OA               | 2 min       | Iso: schwaches Signal<br>AK: schwaches Signal                |
| 5 % BSA              | 1:150 in PBS             | RA               | 2 min       | Iso: schwaches Signal<br>AK: leicht stärkeres Signal         |
| 5 % BSA              | 1:150 in PBS             | Gehirn,<br>Niere | 5, 3 min    | Iso: starker Hintergrund<br>AK: einzelne Signale             |
| 5 % Milchpulver      | 1:900 in PBS             | OA               | 10 min      | Iso: leichtes/kein Signal<br>AK: keins/unspezifisch          |
| 5 % Milchpulver      | 1:900 in PBS             | RA               | 10 min      | Iso: kein Signal<br>AK: kein/leichtes Signal                 |
| 5 % Milchpulver      | 1:900 in PBS             | OA, RA           | 30 min      | Iso: stark / leicht<br>AK: unspezifisch / keins              |

Es ergab sich dabei die Problematik, dass kein klares Signal des CD9-AKs erkennbar war und sich starke Signale in der Isotypkontrolle zeigten. Auch Kontrollgewebe (Lunge und Dickdarm), auf denen eine Expression von CD9 bereits nachgewiesen wurde, zeigten nur unspezifische Signale. Aufgrund der parallelen, erfolgreichen Etablierung der Tetraspanine CD63, CD81 und CD151 wurde die Etablierung für CD9 im Rahmen dieser Dissertation nicht fortgeführt. Die beste Etablierungsvariante für die IHC von CD9 ist in Abb. 18 gezeigt.



**Abb. 18: Bilder der besten Etablierungsvariante für die CD9-Immunhistochemie**

Gezeigt sind Bilder der Immunhistochemie-Etablierungsvariante mit einem 5% BSA-Block und dem Lösen der Antikörper in PBS. Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung stellt die Struktur des Gewebes dar. Während die Negativkontrolle kein Signal zeigt, finden sich bei der Isotypkontrolle und dem CD9-Antikörper ähnliche Signale (rot), welche vergleichsweise beim CD9-Antikörper kaum stärker ausgeprägt sind. Zellen in *lining layer*, Gefäßen und *sublining* sind auch in der Isotypkontrolle signalgebend.

## **4.1.5 Doppel-Immunfluoreszenz von CD81 und CD151**

### **4.1.5.1 Etablierung der Doppel-Immunfluoreszenz**

Zum Veranschaulichen der Lagebeziehung verschiedener Tetraspanine zueinander wurde eine Doppel-IF-Färbung geplant. Besonders bei CD81 und CD151 ließ sich bei der Auswertung eine unterschiedliche Lokalisation beobachten. Die Antikörper beider Tetraspanine wurden in unterschiedlichen Spezies generiert, sodass die jeweiligen etablierten Protokolle sich vereinbaren ließen und unterschiedlich fluoreszierende Sekundär-AK in rot und grün verwendet werden konnten. Die Protokolle der IF-Färbungen wurden kombiniert und eine Doppel-IF mit Blocken mittels 5 % Milchpulver oder 5 % BSA, der monoklonalen, in Maus generierten, anti-humanen Isotypkontrolle (BD, Pharmingen, 1:250 in PBS) oder der polyklonalen, in Kaninchen generierten, anti-humanen Isotypkontrolle (biorbyt, 1:900 in PBS), dem monoklonalen, in Maus generierten, anti-humanen CD81-Primär-AK (abcam, 1:1000 in PBS) oder dem polyklonalen, in Kaninchen generierten, anti-humanen CD151-Primär-AK (biorbyt, 1:450 in PBS) sowie den polyklonalen Sekundärantikörpern Alexa Fluor 488 (ThermoFisher, in Ziege generiert, Anti-Maus, 1:500 in PBS) und Cy3 (Jackson-ImmunoResearch, in Ziege generiert, Anti-Kaninchen, 1:250 in PBS) durchgeführt. Das Basisprotokoll der Doppel-IF ist unter Kapitel 3.4 beschrieben. Für die beiden Block-Varianten wurden unterschiedliche Gewebeproben verwendet. Jeweils drei OA- und drei RA-Gewebe wurden pro Block-Variante gefärbt und jeweils eine Negativ- und Isotypkontrolle mitgeführt und gemeinsam in einem Doppel-IF-Durchlauf angesetzt. Beide Varianten zeigten gute Signale sowie negative Kontrollen, sodass beide Protokoll-Varianten zur Auswertung hinzugezogen wurden. Mittels Mikroskops und digitaler Kamera wurden die Gewebeschnitte in verschiedenen Vergrößerungen fotografisch dokumentiert.

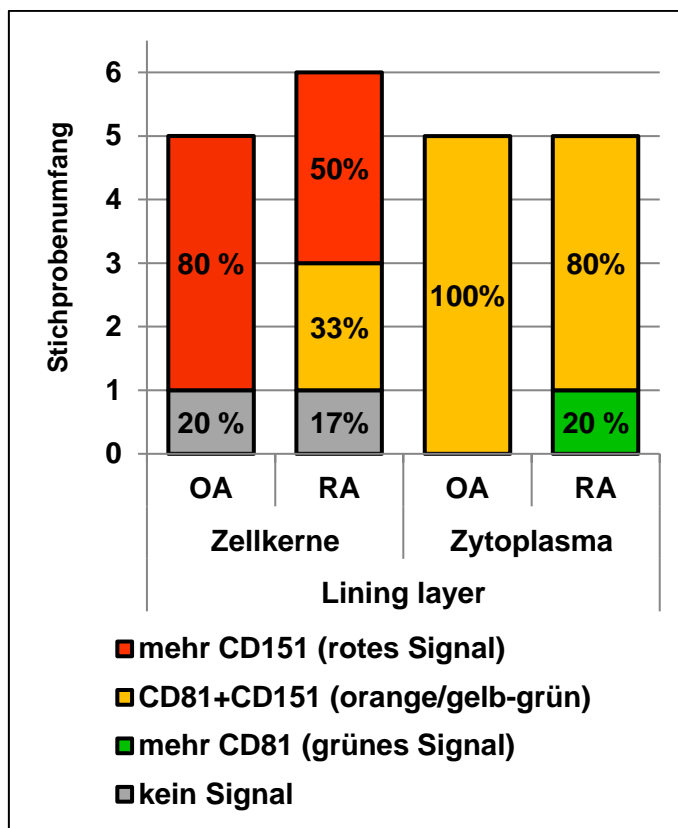
### **4.1.5.2 Auswertung der Doppel-Immunfluoreszenzsignale von CD81 und CD151**

Für die Auswertung der Doppel-IF-Färbung von CD81 und CD151 wurden die dokumentierten Aufnahmen der Schnitte anhand des in den Methoden beschriebenen Scores zur Auswertung der Doppel-IF (s. Kapitel 3.10.1.4) und den dazugehörigen Umgebungsbedingungen ausgewertet (s. Tab. 43).

Für die Gruppen OA bzw. RA wurden jeweils zwei verschiedene Block-Varianten mit einer Stichprobenmenge von jeweils drei Gewebeproben verwendet. Um auszuschließen, dass die verschiedenen Block-Varianten einen Einfluss auf das Ergebnis bzw. die Auswertung der Immunfluoreszenz nahmen, wurden alle Gewebe in einem IF-Durchlauf gefärbt und für jede Block Variante sowohl die Negativ- als auch die

Isotypkontrolle mitgeführt. In den jeweiligen Kontrollen ließen sich für die Block-Lösungen 5 % BSA und 5 % Milchpulver keine Unterschiede feststellen. Somit wurden beide Block-Varianten in der Gruppe OA oder RA zusammengeführt und graphisch ausgewertet (s. Abb. 19 bis Abb. 21). Repräsentative Bilder sind in Abb. 22 dargestellt.

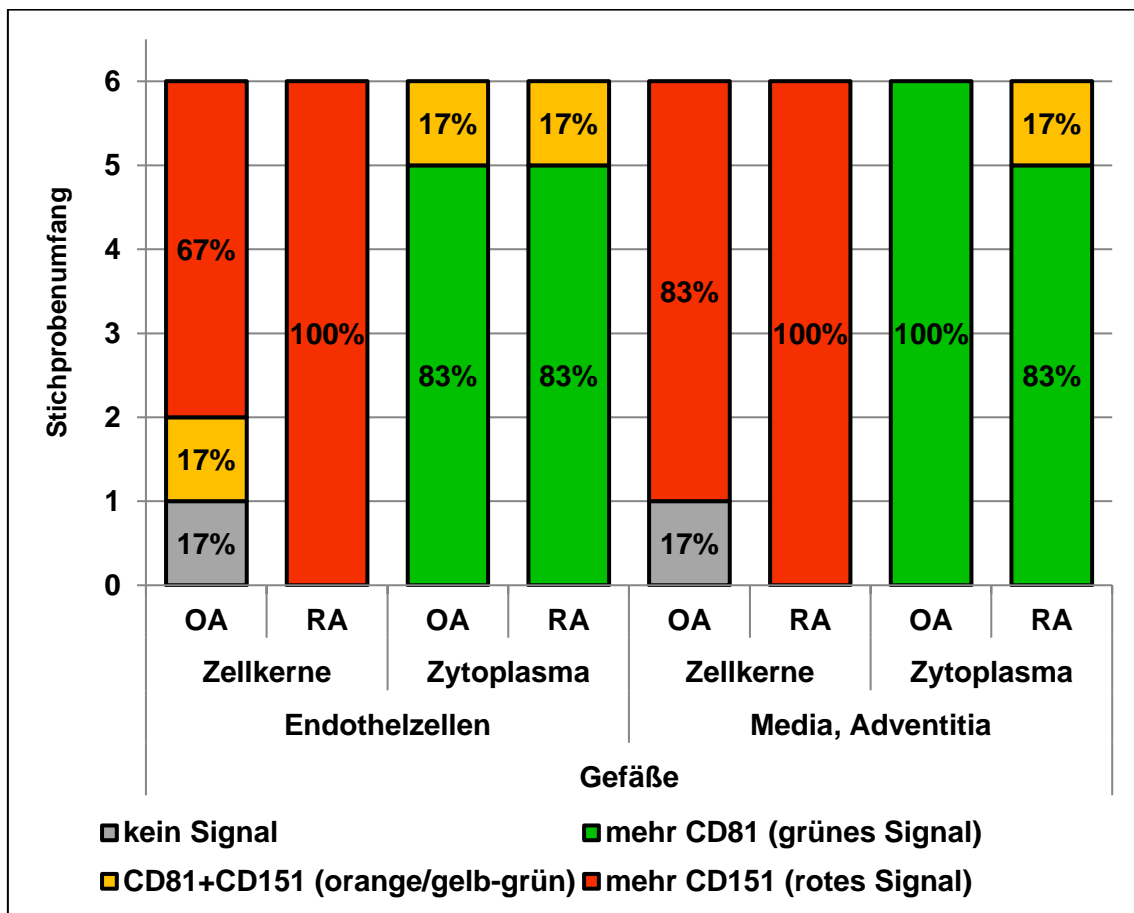
Im Bereich der Zellkerne des *lining layers* konnte bei 80 % der OA-Gewebe ein Signal des CD151-AKs beobachtet werden. 20 % der Zellkerne zeigten kein Signal. Ein Signal des CD81-AKs konnte bei diesen OA-Geweben nicht gefunden werden. Bei RA-Gewebe wiesen dagegen 33 % der Zellkerne im *lining layer* ein Signal beider Tetraspanine auf, 50 % zeigten nur ein Signal des CD151-AKs und 17 % kein Signal. Wurde der zytoplasmatische Bereich der Zellen im *lining layer* betrachtet, ergaben sich bei allen OA-Geweben Signale beider Tetraspanine. Dies betraf für die RA-Gewebe einen Anteil von 80 %, während 20 % der Zellen nur Signale vom CD81-AK aufwiesen (s. Abb. 19).



**Abb. 19: Ergebnis der Expressionsverteilung für die Antikörper-Signale bei der Doppel-Immunfluoreszenz von CD81 und CD151 in der Kategorie *lining layer***

Als Anteil am Stichprobenumfang (Datenbeschriftung in Prozent) dargestellt ist die Anzahl der Gewebeprobe, welche bei der Doppel-Immunfluoreszenz die entsprechende Expressionsverteilung der beiden Antikörper gegen CD81 und CD151 aufwiesen (kein Signal, mehr CD81, CD81+CD151 oder mehr CD151). Einzeln betrachtet wurden die Zellbereiche Zellkern und Zytoplasma. Dabei wurden Signale beurteilt, die sich auf die entsprechenden Bereiche projizieren. Eine eindeutige Zuordnung zu diesen Zellarealen ist jedoch aufgrund der Zweidimensionalität der Bilddokumentation der histologischen Methode nicht gewährleistet. Jede Unterkategorie ist nochmals in die Gruppen OA und RA unterteilt.

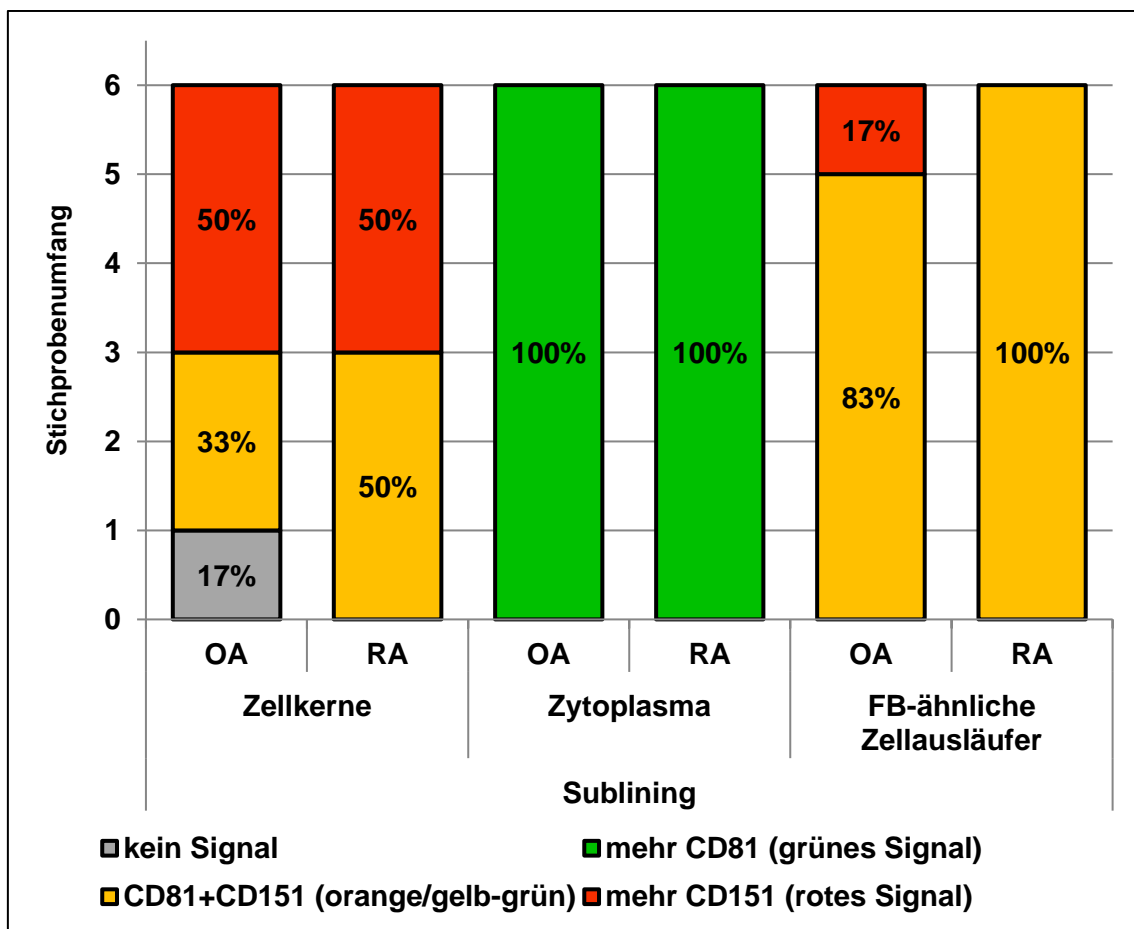
Im Bereich der Gefäße ergab sich für die Zellkerne der Endothelzellen eine Verteilung von 67 % der OA-Gewebe mit Signal vom CD151-AK, 17 % mit CD81- und CD151-Signal und 17 % ohne Signal. RA-Gewebe wiesen ausschließlich Signale vom CD151-AK auf. Im zytoplasmatischen Bereich ließ sich sowohl bei OA- als auch bei RA-Geweben ein Anteil von 83 % mit CD81-Signal sowie ein Anteil von 17 % mit dem Signal beider Tetraspanine verzeichnen. Wurden die Media und Adventitia der Gefäße betrachtet, zeigten Zellkerne von 83 % der OA-Gewebe ein Signal des CD151-AKs und 17 % kein Signal. Bei RA-Geweben wurde ausschließlich ein CD151-Signal der Zellkerne beobachtet. Im zytoplasmatischen Bereich der Zellen ließ sich bei allen OA-Geweben ein Signal des CD81-AKs finden. Bei RA-Geweben betrug dieser Anteil 83 %. 17 % der RA-Gewebe wiesen ein Signal beider Tetraspanine auf (s. Abb. 20).



**Abb. 20: Ergebnis der Expressionsverteilung für die Antikörper-Signale bei der Doppel-Immunfluoreszenz von CD81 und CD151 in den Gefäßen**

Als Anteil am Stichprobenumfang (Datenbeschriftung in Prozent, gerundet) dargestellt ist die Anzahl der Gewebeprobe, welche bei der Doppel-Immunfluoreszenz die entsprechende Expressionsverteilung der beiden Antikörper gegen CD81 und CD151 aufwiesen (kein Signal, mehr CD81, CD81+CD151 oder mehr CD151). Einzeln betrachtet wurden die Zellbereiche Zellkern und Zytoplasma. Dabei wurden Signale beurteilt, die sich auf die entsprechenden Bereiche projizieren. Eine eindeutige Zuordnung zu diesen Zellarealen ist jedoch aufgrund der Zweidimensionalität der Bilddokumentation der histologischen Methode nicht gewährleistet. Jede Unterkategorie ist nochmals in die Gruppen OA und RA unterteilt.

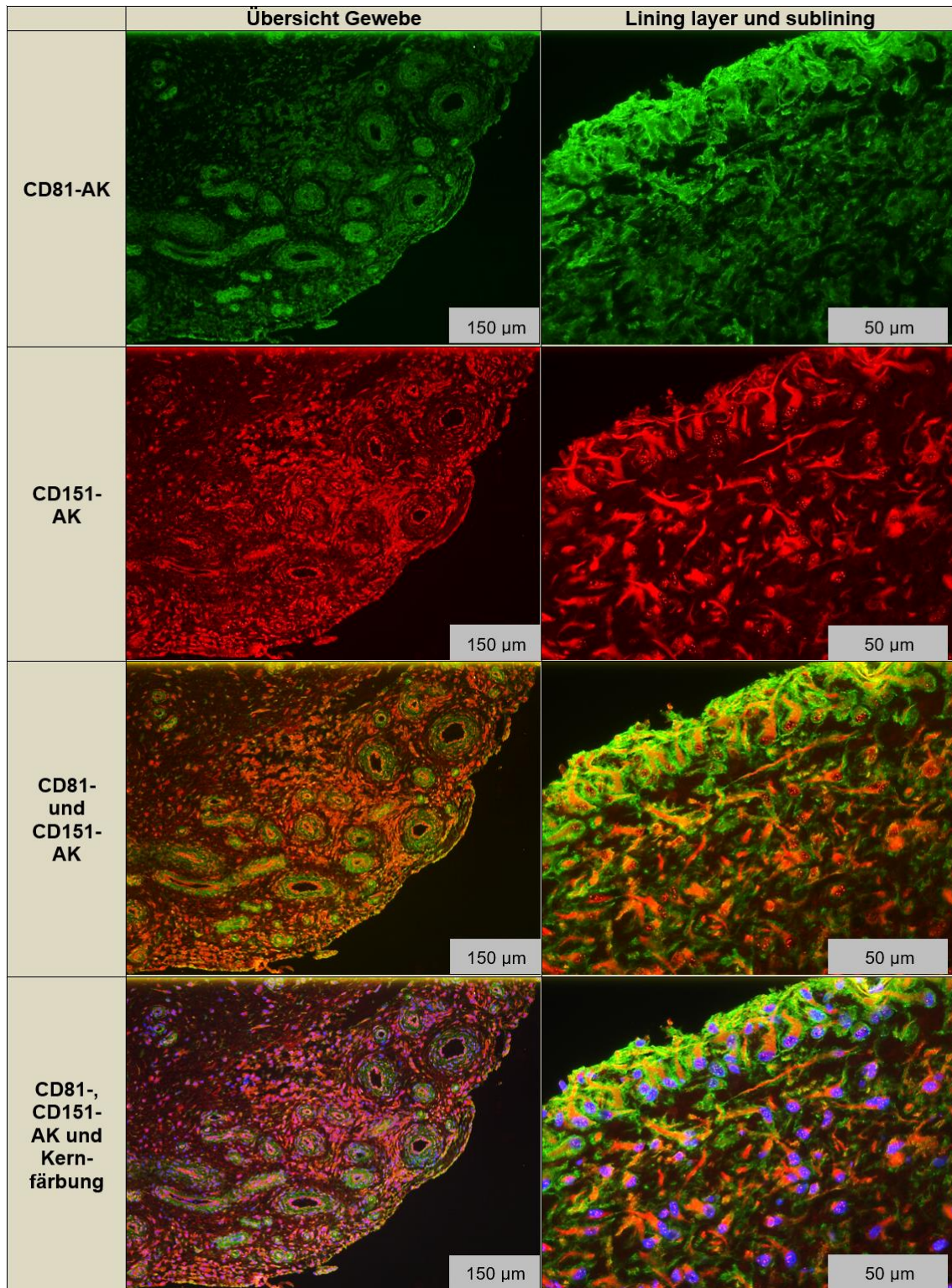
Im Bereich des *sublinings* zeigte sich in den Zellkernen bei 50 % der OA-Gewebe ein Signal des CD151-AKs. 33 % der OA-Gewebe ließen Signale von beiden Tetraspaninen und 17 % kein Signal erkennen. Auch 50 % der RA-Gewebe wiesen ein Signal des CD151-AKs auf, während sich bei der anderen Hälfte der RA-Gewebe Signale beider Tetraspanine fanden. Wurde der zytoplasmatische Bereich der Zellen betrachtet, wurde bei allen OA- und RA-Gewebe ausschließlich ein Signal des CD81-AKs beobachtet. Die im *sublining* auffallenden Zellausläufer, welche denen von Fibroblasten ähneln, zeigten bei 83 % der OA-Gewebe Signale beider Tetraspanine sowie bei 17 % nur Signale des CD151-AKs. Bei allen RA-Geweben ergaben sich sowohl CD81- als auch CD151-Signale (s. Abb. 21).

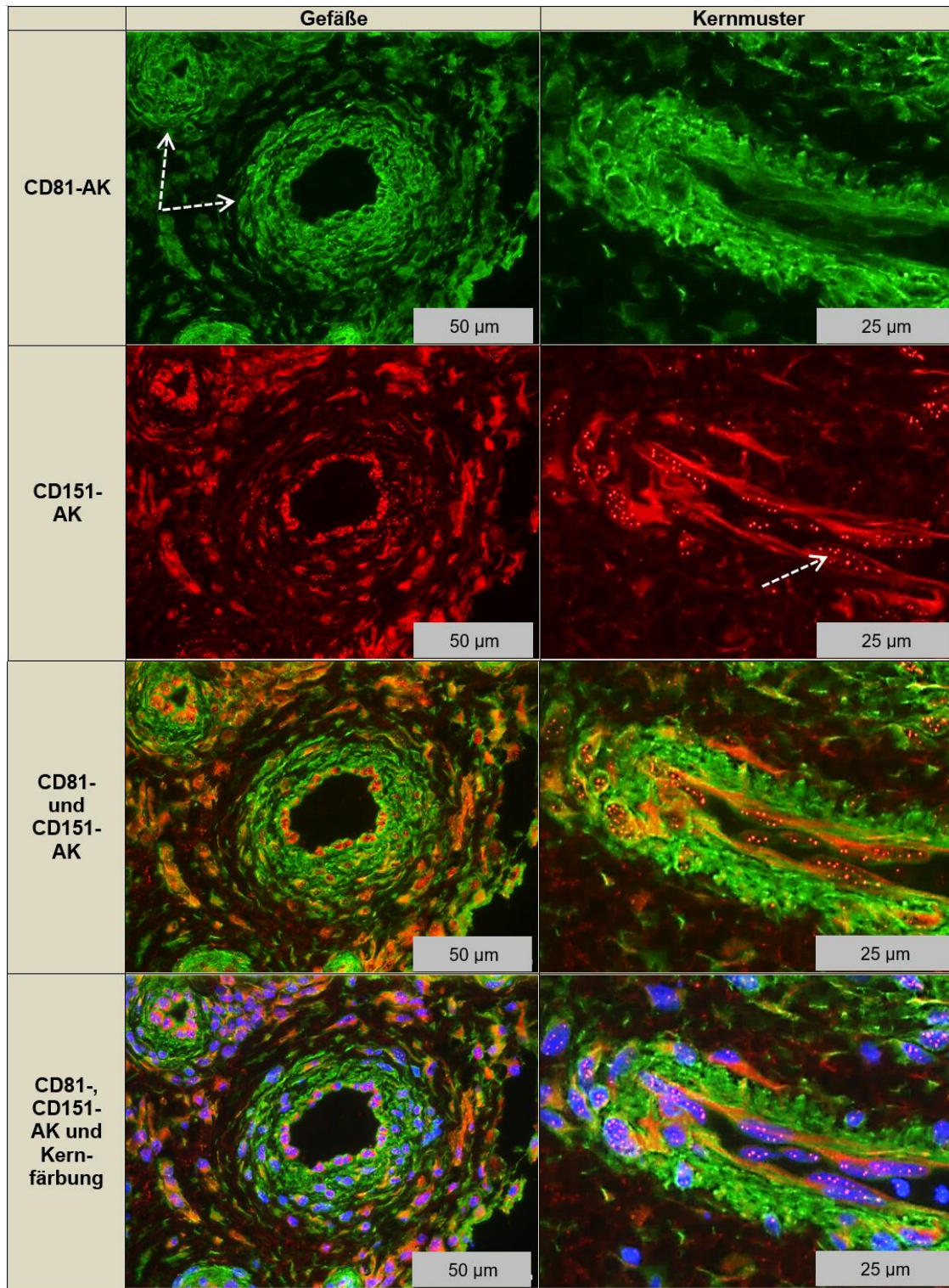


**Abb. 21: Ergebnis der Expressionsverteilung für die Antikörper-Signale bei der Doppel-Immunfluoreszenz von CD81 und CD151 im *sublining***

Als Anteil am Stichprobenumfang (Datenbeschriftung in Prozent) dargestellt ist die Anzahl der Gewebeprobe, welche bei der Doppel-Immunfluoreszenz die entsprechende Expressionsverteilung der beiden Antikörper gegen CD81 und CD151 aufwiesen (kein Signal, mehr CD81, CD81+CD151 oder mehr CD151). Einzeln betrachtet wurden die Zellbereiche Zellkern, Zytoplasma und Fibroblasten (FB)-ähnlichen Zellausläufer. Dabei wurden Signale beurteilt, die sich auf die entsprechenden Bereiche projizieren. Eine eindeutige Zuordnung zu diesen Zellarealen ist jedoch aufgrund der Zweidimensionalität der Bilddokumentation der histologischen Methode nicht gewährleistet. Jede Unterkategorie ist nochmals in die Gruppen OA und RA unterteilt.

Die Daten der Doppel-IF wurden im Hinblick auf eine möglicherweise vorliegende Tendenz untersucht. Auf eine weitere statistische Analyse wurde aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs verzichtet.





**Abb. 22: Repräsentative Doppel-IF-Färbung eines Gewebes für CD81/CD151**

Die Abbildung zeigt ein Gewebe, welches das Ergebnis der Doppel-IF-Färbung für die Tetraspanine CD81 (grünes Signal) und CD151 (rotes Signal) repräsentativ darstellt. Zellen des *lining layer*, der Gefäße (s. Pfeile) und des *sublinings* zeigen für das gesamte Gewebe eine starke Färbung. Auffallend ist das Signal des CD81-Antikörpers sowohl in den Schichten des *lining layers*, als auch in Media/Adventitia der Gefäße. CD151-Signal ist besonders in Endothelzellen und Zellen des *sublinings* mit ihren Zellausläufern hervorsteckend. Auch die isolierten Signale (s. Pfeil) im Bereich der Zellkerne (blau) durch den CD151-Antikörper heben sich hervor. Überlagerungen beider Antikörper-Signale erscheinen grün-gelb bis orange.

**Tab. 43: Score-Werte der CD81- und CD151-Signale in der Doppel-Immunfluoreszenz**

Für die jeweiligen Gewebeproben wurden die zugewiesenen Score-Werte der verschiedenen Kategorien dargestellt. Definiert wurden die Score-Werte als „Kategorie/ Areal nicht vorhanden“ (-), „keine Färbung vorhanden“ (0), „hauptsächlich CD81 exprimiert (grünes Signal)“ (1), „CD81 und CD151 in gleichem Ausmaß exprimiert (orange/gelb-grünes Signal)“ (2) und „hauptsächlich CD151 exprimiert (rotes Signal)“ (3). Die verwendete Block-Lösung wurde notiert.

| Gewebeprobe |             | Block-Lösung    | Lining layer |            | Gefäße         |            |                   |            |
|-------------|-------------|-----------------|--------------|------------|----------------|------------|-------------------|------------|
|             |             |                 |              |            | Endothelzellen |            | Media, Adventitia |            |
|             |             |                 | Zellkerne    | Zytoplasma | Zellkerne      | Zytoplasma | Zellkerne         | Zytoplasma |
| OA          | OA415 Syn4  | 5 % Milchpulver | -            | -          | 3              | 1          | 3                 | 1          |
|             | OA417 Syn4  | 5 % Milchpulver | 3            | 2          | 3              | 1          | 3                 | 1          |
|             | OA418 Syn2  | 5 % BSA         | 3            | 2          | 2              | 1          | 3                 | 1          |
|             | OA419 Syn3  | 5 % Milchpulver | 3            | 2          | 3              | 1          | 3                 | 1          |
|             | OABN93 Syn4 | 5 % BSA         | 0            | 2          | 0              | 2          | 0                 | 1          |
|             | OABN95 Syn4 | 5 % BSA         | 3            | 2          | 3              | 1          | 3                 | 1          |
| n           |             |                 | 5            | 5          | 6              | 6          | 6                 | 6          |
| RA          | RA376 Syn2  | 5 % Milchpulver | 3            | 2          | 3              | 1          | 3                 | 1          |
|             | RA386 Syn4  | 5 % Milchpulver | 2            | 2          | 3              | 1          | 3                 | 2          |
|             | RA389 Syn2  | 5 % BSA         | 3            | 1          | 3              | 2          | 3                 | 1          |
|             | RA391 Syn3  | 5 % Milchpulver | -            | -          | 3              | 1          | 3                 | 1          |
|             | RA397 Syn3  | 5 % BSA         | 3            | 2          | 3              | 1          | 3                 | 1          |
|             | RA402 Syn4  | 5 % BSA         | 2            | 2          | 3              | 1          | 3                 | 1          |
| n           |             |                 | 5            | 5          | 6              | 6          | 6                 | 6          |

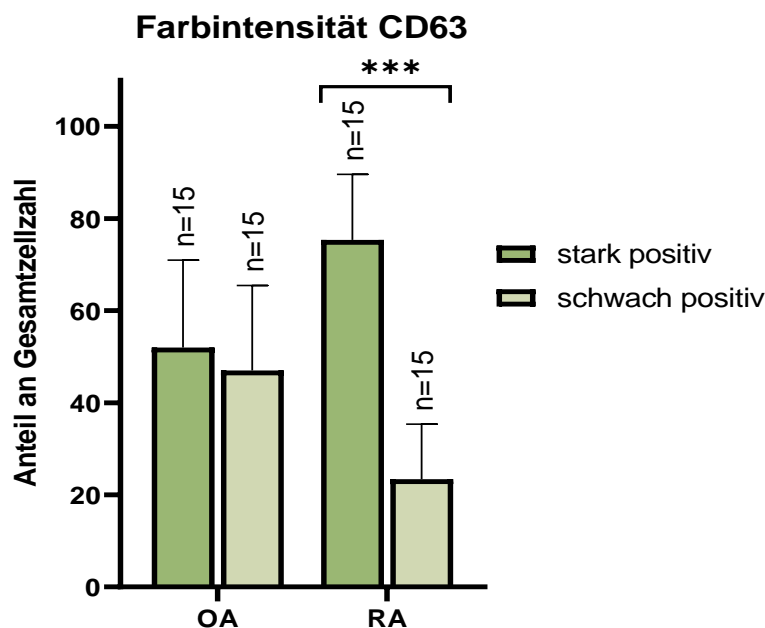
| Gewebeprobe |             | Block-Lösung    | Sublining |            |                                     |
|-------------|-------------|-----------------|-----------|------------|-------------------------------------|
|             |             |                 | Zellkerne | Zytoplasma | Fibroblasten-ähnliche Zellausläufer |
| OA          | OA415 Syn4  | 5 % Milchpulver | 3         | 1          | 2                                   |
|             | OA417 Syn4  | 5 % Milchpulver | 3         | 1          | 2                                   |
|             | OA418 Syn2  | 5 % BSA         | 2         | 1          | 2                                   |
|             | OA419 Syn3  | 5 % Milchpulver | 2         | 1          | 2                                   |
|             | OABN93 Syn4 | 5 % BSA         | 0         | 1          | 3                                   |
|             | OABN95 Syn4 | 5 % BSA         | 3         | 1          | 2                                   |
| n           |             |                 | 6         | 6          | 6                                   |
| RA          | RA376 Syn2  | 5 % Milchpulver | 3         | 1          | 2                                   |
|             | RA386 Syn4  | 5 % Milchpulver | 2         | 1          | 2                                   |
|             | RA389 Syn2  | 5 % BSA         | 3         | 1          | 2                                   |
|             | RA391 Syn3  | 5 % Milchpulver | 2         | 1          | 2                                   |
|             | RA397 Syn3  | 5 % BSA         | 2         | 1          | 2                                   |
|             | RA402 Syn4  | 5 % BSA         | 3         | 1          | 2                                   |
| n           |             |                 | 6         | 6          | 6                                   |

#### 4.1.6 Auswertung der Farbintensität

Für die Auswertung der Farbintensität von Zellen im *sublining* wurden die Zellen den drei Kategorien negativ, schwach positiv und stark positiv gefärbt zugeteilt. Dafür wurden die im Rahmen der IF-Färbungen der Tetraspanine CD63, CD81 und CD151 dokumentierten Aufnahmen der Schnitte anhand des in den Methoden beschriebenen Scores zur Auswertung der Farbintensität und den dazugehörigen Umgebungsbedingungen (s. Kapitel 3.10.1.5) ausgewertet. Die Ergebnisse der jeweiligen Tetraspanine sind in den Tab. 45 bis Tab. 47 dargestellt.

Der Datensatz der Score-Ergebnisse wurde graphisch ausgewertet (s. Abb. 23 bis Abb. 25). Die Anzahl von Zellen mit fehlender Färbung fiel bei allen Tetraspaninen gering aus, sodass diese Kategorie nicht dargestellt wurde.

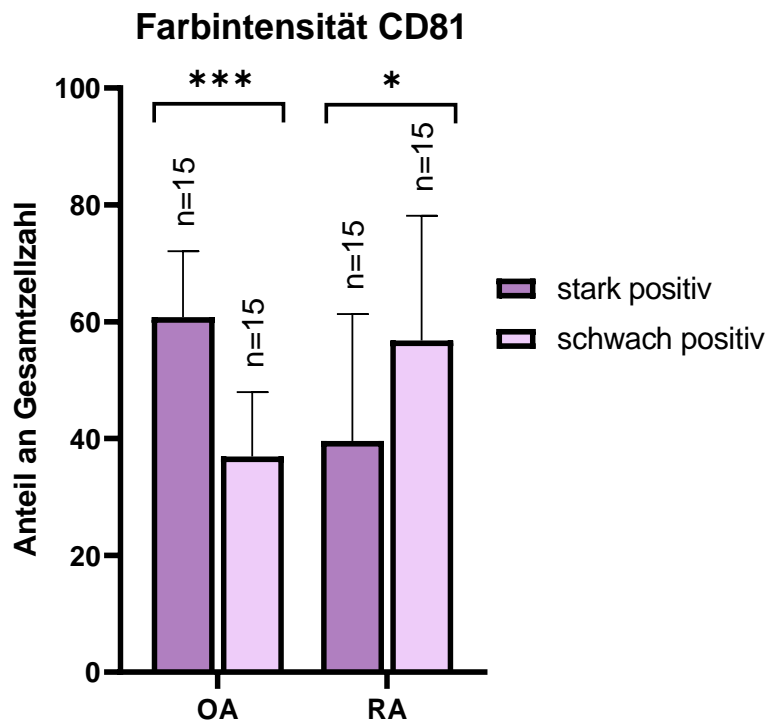
Bei der statistischen Auswertung des Tetraspanins CD63 ergab sich für die OA-Gewebe kein signifikanter Unterschied zwischen stark und schwach positiv gefärbten Zellen ( $p=0,641$ ). In der Gruppe der RA-Gewebe zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied ( $p<0,001$ ). So lag der Anteil stark positiv gefärbter Zellen bei RA-Gewebe durchschnittlich bei 75,3 %, während der Anteil schwach gefärbter Zellen im Mittel bei 23,4 % lag.



**Abb. 23: Durchschnittliche Anteile der im Rahmen der CD63-Immunfluoreszenz im *sublining* stark und schwach positiv gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl in OA- und RA-Gewebe**

Es wurden die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Anteile für CD63 stark und schwach positiv gefärbter Zellen an der Gesamtzellzahl für OA- bzw. RA-Gewebe berechnet, und ein multipler Vergleichstest nach Šídák durchgeführt. Die Stichproben sind auf dem Signifikanzniveau von 0,05 (\*), 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*) signifikant unterschiedlich.

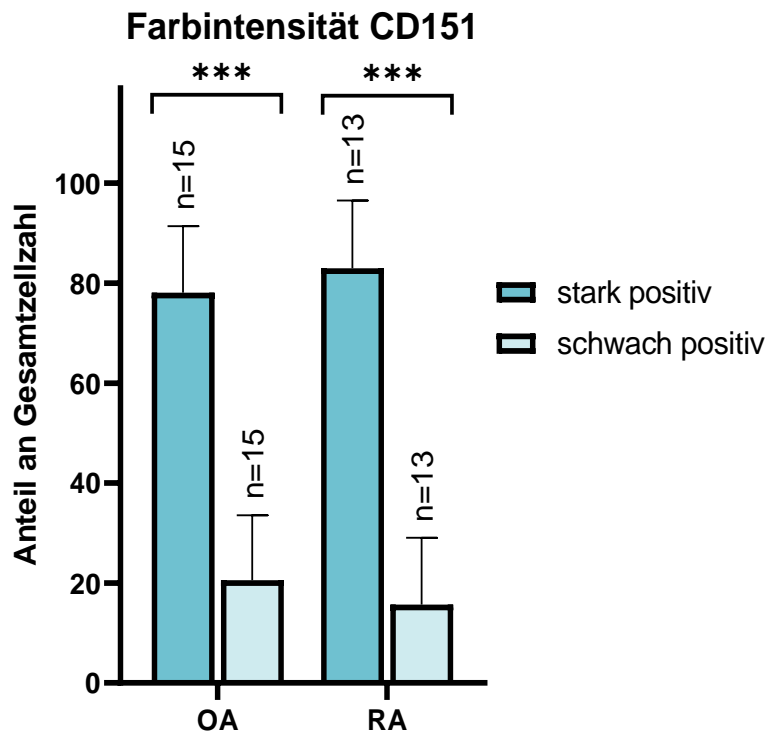
Die Resultate für das Tetraspanin CD81 zeigten einen hochsignifikanten Unterschied zwischen stark und schwach positiven Zellen für die OA-Gruppe ( $p < 0,001$ ). Der Anteil stark positiv gefärbter Zellen belief sich durchschnittlich auf 60,8 %. Der Anteil schwach positiv gefärbter Zellen betrug im Mittel 36,9 %. Für die RA-Gruppe ergab sich ein schwach signifikanter Unterschied bei durchschnittlich 39,6 % stark positiver und 56,8 % schwach positiver Zellen ( $p = 0,016$ ).



**Abb. 24: Durchschnittliche Anteile der im Rahmen der CD81-Immunfluoreszenz im *sublining* stark und schwach positiv gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl in OA- und RA-Gewebe**

Es wurden die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Anteile für CD81 stark und schwach positiv gefärbter Zellen an der Gesamtzellzahl für OA- bzw. RA-Gewebe berechnet. und ein multipler Vergleichstest nach Šidák durchgeführt. Die Stichproben sind auf dem Signifikanzniveau von 0,05 (\*), 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*) signifikant unterschiedlich.

Eine Testung der Daten von CD151 ergab sowohl für die Gruppe der OAs als auch für die Gruppe der RA einen hohen signifikanten Unterschied zwischen stark und schwach positiven Zellen für beide Gruppen ( $<0,001$ ). Für OA-Gewebe ließ sich im Mittel ein Anteil von 78,1 % stark gefärbter sowie 20,5 % schwach gefärbter Zellen beobachten. Bei RA-Gewebe belief sich der Anteil stark positiver Zellen durchschnittlich auf 83,0 %, während im Mittel 15,7 % der Zellen eine schwach positive Färbung aufwiesen.



**Abb. 25: Durchschnittliche Anteile der im Rahmen der CD151-Immunfluoreszenz im *sublining* stark und schwach positiv gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl in OA- und RA-Gewebe**

Es wurden die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen der Anteile für CD151 stark und schwach positiv gefärbter Zellen an der Gesamtzellzahl für OA- bzw. RA-Gewebe berechnet, und ein multipler Vergleichstest nach Šidák durchgeführt. Die Stichproben sind auf dem Signifikanzniveau von 0,05 (\*), 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*) signifikant unterschiedlich.

Weiterhin wurde ein multipler Vergleichstest für jedes Tetraspanin durchgeführt, welcher die Gruppen der schwach bzw. stark positiv gefärbten Zellen in OA- bzw. RA-Gewebe miteinander auf signifikante Unterschiede testete (Tab. 44).

**Tab. 44: Ergebnisse multipler Vergleichstests für schwach bzw. stark positiv gefärbter Zellen im *sublining* der OA- bzw. RA-Gewebe für die Tetraspanine CD63, CD81 und CD151**  
Es wurde ein Signifikanz-Test nach Tukey für die Farbintensitäts-Kategorien der OA und RA durchgeführt. Die Stichproben sind auf dem Signifikanzniveau von 0,05 (\*), 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*) signifikant unterschiedlich.

| Vergleichspaare                             | p-Wert    |
|---|-----------|
| <b>CD63</b>                                 |           |
| OA: stark positiv vs. OA: schwach positiv   | 0,832     |
| OA: stark positiv vs. RA: stark positiv     | 0,001**   |
| OA: stark positiv vs. RA: schwach positiv   | <0,001*** |
| OA: schwach positiv vs. RA: stark positiv   | <0,001*** |
| OA: schwach positiv vs. RA: schwach positiv | 0,001**   |
| RA: stark positiv vs. RA: schwach positiv   | <0,001*** |
| <b>CD81</b>                                 |           |
| OA: stark positiv vs. OA: schwach positiv   | 0,002**   |
| OA: stark positiv vs. RA: stark positiv     | 0,007**   |
| OA: stark positiv vs. RA: schwach positiv   | 0,919     |
| OA: schwach positiv vs. RA: stark positiv   | 0,974     |
| OA: schwach positiv vs. RA: schwach positiv | 0,013*    |
| RA: stark positiv vs. RA: schwach positiv   | 0,039*    |
| <b>CD151</b>                                |           |
| OA: stark positiv vs. OA: schwach positiv   | <0,001*** |
| OA: stark positiv vs. RA: stark positiv     | 0,762     |
| OA: stark positiv vs. RA: schwach positiv   | <0,001*** |
| OA: schwach positiv vs. RA: stark positiv   | <0,001*** |
| OA: schwach positiv vs. RA: schwach positiv | 0,772     |
| RA: stark positiv vs. RA: schwach positiv   | <0,001*** |

Für CD63 zeigten sich die Gruppen OA: stark positiv vs. RA: schwach positiv, OA: schwach positiv vs. RA: stark positiv sowie RA: stark positiv vs. RA: schwach positiv signifikant unterschiedlich auf einem Niveau von  $p=0,001$ . Die Gruppen OA: stark positiv vs. RA: stark positiv und OA: schwach positiv vs. RA: schwach positiv ergaben einen signifikanten Unterschied ( $p=0,01$ ).

Bei CD81 ließen sich signifikante Unterschiede mit  $p=0,01$  für die Gruppen OA: stark positiv vs. OA: schwach positiv und OA: stark positiv vs. RA: stark positiv sowie signifikante Unterschiede mit  $p=0,05$  für OA: schwach positiv vs. RA: schwach positiv und RA: stark positiv vs. RA: schwach positiv verzeichnen.

Für das Tetraspanin CD151 wurden signifikante Unterschiede mit  $p=0,001$  für die Gruppen OA: stark positiv vs. OA: schwach positiv, OA: stark positiv vs. RA: schwach positiv, OA: schwach positiv vs. RA: stark positiv und RA: stark positiv vs. RA: schwach positiv gefunden.

**Tab. 45: Score-Mittelwerte der Immunfluoreszenz-Farbindensität zu CD63 von Zellen im *sublining* für alle OA und RA**

Arithmetische Mittelwerte aus den Score-Werten der drei verschiedenen Scorer zu jeder Auswertungskategorie, welche für jedes OA- oder RA-Gewebe einzeln berechnet wurden.

| Gewebeprobe | 400x<br>Bild-Nr. | Gesamt-<br>zahl | stark positiv |        | schwach positiv |        | negativ |      |
|-------------|------------------|-----------------|---------------|--------|-----------------|--------|---------|------|
|             |                  |                 | Anzahl        | Anteil | Anzahl          | Anteil |         |      |
| OA          | OA358 Syn7       | 5               | 20,33         | 16,00  | 79%             | 4,33   | 21%     | 0,00 |
|             | OA379 Syn5       | 3               | 52,33         | 25,67  | 55%             | 26,67  | 45%     | 0,00 |
|             | OA382 Syn3       | 3               | 97,33         | 87,67  | 91%             | 9,67   | 9%      | 0,00 |
|             | OA391 Syn4       | 5               | 49,67         | 31,00  | 66%             | 18,67  | 34%     | 0,00 |
|             | OA393 Syn4       | 4               | 36,67         | 3,33   | 9%              | 33,00  | 90%     | 0,33 |
|             | OA398 Syn4       | 2               | 51,00         | 21,67  | 44%             | 27,67  | 53%     | 1,67 |
|             | OA413 Syn3       | 3               | 47,00         | 24,00  | 50%             | 22,67  | 49%     | 0,33 |
|             | OA415 Syn4       | 1               | 73,00         | 42,00  | 57%             | 30,67  | 43%     | 0,33 |
|             | OA417 Syn4       | 1               | 67,00         | 39,00  | 57%             | 27,33  | 42%     | 0,67 |
|             | OA418 Syn2       | 3               | 65,00         | 39,67  | 61%             | 25,00  | 39%     | 0,33 |
|             | OA419 Syn3       | 2               | 74,00         | 29,33  | 39%             | 43,33  | 59%     | 1,33 |
|             | OA425 Syn4       | 3               | 31,67         | 11,67  | 37%             | 19,67  | 62%     | 0,33 |
|             | OA476 Syn3       | 1               | 63,00         | 29,67  | 44%             | 32,33  | 54%     | 1,00 |
|             | OABN93 Syn4      | 3               | 42,00         | 19,33  | 45%             | 22,00  | 53%     | 0,67 |
|             | OABN95 Syn4      | 2               | 70,67         | 33,67  | 46%             | 36,00  | 52%     | 1,00 |
| n           |                  | 15              | 15            | 15     | 15              | 15     | 15      |      |
| RA          | RA375 Syn3       | 1               | 46,67         | 17,67  | 37%             | 22,67  | 49%     | 6,33 |
|             | RA376 Syn2       | 5               | 35,00         | 31,00  | 88%             | 3,33   | 10%     | 0,67 |
|             | RA382 Syn3       | 2               | 33,67         | 28,67  | 86%             | 5,00   | 14%     | 0,00 |
|             | RA384 Syn4       | 3               | 128,00        | 105,33 | 81%             | 22,67  | 19%     | 0,00 |
|             | RA385 Syn2       | 2               | 73,67         | 55,67  | 73%             | 18,00  | 27%     | 0,00 |
|             | RA386 Syn4       | 1               | 74,67         | 59,67  | 78%             | 15,00  | 22%     | 0,00 |
|             | RA389 Syn2       | 3               | 43,67         | 27,67  | 60%             | 16,00  | 40%     | 0,00 |
|             | RA391 Syn3       | 1               | 73,33         | 52,00  | 73%             | 21,33  | 27%     | 0,00 |
|             | RA397 Syn3       | 3               | 46,00         | 39,67  | 84%             | 6,33   | 16%     | 0,00 |
|             | RA402 Syn4       | 2               | 36,33         | 28,00  | 75%             | 8,00   | 24%     | 0,33 |
|             | RA406 Syn4       | 3               | 101,33        | 67,00  | 66%             | 33,67  | 34%     | 0,67 |
|             | RA419 Syn2       | 3               | 92,67         | 91,33  | 93%             | 1,33   | 7%      | 0,00 |
|             | RA421 Syn3       | 4               | 38,67         | 35,67  | 93%             | 3,00   | 7%      | 0,00 |
|             | RA434 Syn4       | 2               | 110,00        | 75,00  | 70%             | 34,33  | 29%     | 0,67 |
| RABN23 Syn3 | 4                | 106,00          | 76,67         | 73%    | 28,33           | 26%    | 1,33    |      |
| n           |                  | 15              | 15            | 15     | 15              | 15     | 15      |      |

**Tab. 46: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Farbintensität zu CD81 von Zellen im *sublining* für alle OA und RA**

Arithmetische Mittelwerte aus den Score-Werten der drei verschiedenen Scorer zu jeder Auswertungskategorie, welche für jedes OA- oder RA-Gewebe einzeln berechnet wurden.

| Gewebeprobe | 40x<br>Bild-Nr. | Gesamt-<br>zahl | stark positiv |        | schwach positiv |        | negativ |   |
|-------------|-----------------|-----------------|---------------|--------|-----------------|--------|---------|---|
|             |                 |                 | Anzahl        | Anteil | Anzahl          | Anteil |         |   |
| OA          | OA358 Syn7      | 5               | 33            | 27     | 82%             | 4      | 12%     | 2 |
|             | OA379 Syn5      | 2               | 30            | 16     | 53%             | 13     | 43%     | 1 |
|             | OA382 Syn3      | 2               | 48            | 30     | 63%             | 18     | 38%     | 0 |
|             | OA391 Syn4      | 5               | 56            | 31     | 55%             | 24     | 43%     | 1 |
|             | OA393 Syn4      | 2               | 18            | 14     | 78%             | 4      | 22%     | 0 |
|             | OA398 Syn4      | 6               | 63            | 29     | 46%             | 33     | 52%     | 1 |
|             | OA413 Syn3      | 1               | 23            | 14     | 61%             | 9      | 39%     | 0 |
|             | OA415 Syn4      | 2               | 45            | 34     | 76%             | 11     | 24%     | 0 |
|             | OA417 Syn4      | 1               | 30            | 17     | 57%             | 12     | 40%     | 1 |
|             | OA418 Syn2      | 2               | 54            | 33     | 61%             | 18     | 33%     | 3 |
|             | OA419 Syn3      | 2               | 47            | 33     | 70%             | 14     | 30%     | 0 |
|             | OA425 Syn4      | 2               | 51            | 24     | 47%             | 26     | 51%     | 1 |
|             | OA476 Syn3      | 4               | 41            | 21     | 51%             | 19     | 46%     | 1 |
|             | OABN93 Syn4     | 3               | 90            | 46     | 51%             | 38     | 42%     | 6 |
|             | OABN95 Syn4     | 3               | 109           | 66     | 61%             | 43     | 39%     | 0 |
| n           |                 | 15              | 15            | 15     | 15              | 15     | 15      |   |
| RA          | RA375 Syn3      | 4               | 69            | 21     | 30%             | 45     | 65%     | 3 |
|             | RA376 Syn2      | 1               | 54            | 41     | 76%             | 11     | 20%     | 2 |
|             | RA382 Syn3      | 3               | 35            | 15     | 43%             | 19     | 54%     | 1 |
|             | RA384 Syn4      | 2               | 65            | 30     | 46%             | 33     | 51%     | 2 |
|             | RA385 Syn2      | 2               | 47            | 21     | 45%             | 26     | 55%     | 0 |
|             | RA386 Syn4      | 3               | 114           | 18     | 16%             | 96     | 84%     | 0 |
|             | RA389 Syn2      | 2               | 43            | 28     | 65%             | 15     | 35%     | 0 |
|             | RA391 Syn3      | 2               | 46            | 21     | 46%             | 24     | 52%     | 1 |
|             | RA397 Syn3      | 6               | 37            | 15     | 41%             | 20     | 54%     | 2 |
|             | RA402 Syn4      | 1               | 36            | 14     | 39%             | 22     | 61%     | 0 |
|             | RA406 Syn4      | 1               | 42            | 4      | 10%             | 33     | 79%     | 5 |
|             | RA419 Syn2      | 2               | 35            | 4      | 11%             | 30     | 86%     | 1 |
|             | RA421 Syn3      | 3               | 29            | 23     | 79%             | 4      | 14%     | 2 |
|             | RA434 Syn4      | 3               | 57            | 17     | 30%             | 37     | 65%     | 3 |
|             | RABN23 Syn3     | 3               | 52            | 9      | 17%             | 40     | 77%     | 3 |
| n           |                 | 15              | 15            | 15     | 15              | 15     | 15      |   |

**Tab. 47: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Farbindensität zu CD151 von Zellen im *sublining* für alle OA und RA**

Arithmetische Mittelwerte aus den Score-Werten der drei verschiedenen Scorer zu jeder Auswertungskategorie, welche für jedes OA- oder RA-Gewebe einzeln berechnet wurden.

| Gewebeprobe | 40x<br>Bild-Nr. | Gesamt-<br>zahl | stark positiv |        | schwach positiv |        | negativ |   |
|-------------|-----------------|-----------------|---------------|--------|-----------------|--------|---------|---|
|             |                 |                 | Anzahl        | Anteil | Anzahl          | Anteil |         |   |
| OA          | OA358 Syn7      | 1               | 109           | 94     | 86%             | 15     | 14%     | 0 |
|             | OA379 Syn5      | 3               | 71            | 58     | 82%             | 12     | 17%     | 1 |
|             | OA382 Syn3      | 2               | 64            | 52     | 81%             | 12     | 19%     | 0 |
|             | OA391 Syn4      | 4               | 44            | 38     | 86%             | 6      | 14%     | 0 |
|             | OA393 Syn4      | 5               | 24            | 16     | 67%             | 8      | 33%     | 0 |
|             | OA398 Syn4      | 3               | 33            | 29     | 88%             | 3      | 9%      | 1 |
|             | OA413 Syn3      | 3               | 70            | 56     | 80%             | 14     | 20%     | 0 |
|             | OA415 Syn4      | 4               | 83            | 76     | 92%             | 7      | 8%      | 0 |
|             | OA417 Syn4      | 1               | 60            | 41     | 68%             | 18     | 30%     | 1 |
|             | OA418 Syn2      | 1               | 42            | 33     | 79%             | 9      | 21%     | 0 |
|             | OA419 Syn3      | 3               | 52            | 41     | 79%             | 11     | 21%     | 0 |
|             | OA425 Syn4      | 2               | 34            | 13     | 38%             | 20     | 59%     | 1 |
|             | OA476 Syn3      | 3               | 43            | 37     | 86%             | 4      | 9%      | 2 |
|             | OABN93 Syn4     | 2               | 38            | 27     | 71%             | 9      | 24%     | 2 |
|             | OABN95 Syn4     | 3               | 77            | 68     | 88%             | 8      | 10%     | 1 |
| n           |                 | 15              | 15            | 15     | 15              | 15     | 15      |   |
| RA          | RA375 Syn3      | 4               | 56            | 40     | 71%             | 16     | 29%     | 0 |
|             | RA376 Syn2      | 2               | 71            | 68     | 96%             | 3      | 4%      | 0 |
|             | RA382 Syn3      | 3               | 79            | 77     | 97%             | 1      | 1%      | 1 |
|             | RA384 Syn4      | 3               | 109           | 98     | 90%             | 9      | 8%      | 2 |
|             | RA385 Syn2      | 2               | 52            | 45     | 87%             | 7      | 13%     | 0 |
|             | RA386 Syn4      | 3               | 191           | 159    | 83%             | 29     | 15%     | 3 |
|             | RA389 Syn2      | 3               | 151           | 117    | 77%             | 29     | 19%     | 5 |
|             | RA391 Syn3      | 3               | 95            | 85     | 89%             | 10     | 11%     | 0 |
|             | RA397 Syn3      | 5               | 111           | 107    | 96%             | 4      | 4%      | 0 |
|             | RA402 Syn4      | 2               | 59            | 48     | 81%             | 11     | 19%     | 0 |
|             | RA406 Syn4      | 2               | 46            | 21     | 46%             | 24     | 52%     | 1 |
|             | RA419 Syn2      | 4               | -             | -      | -               | -      | -       | - |
|             | RA421 Syn3      | 1               | -             | -      | -               | -      | -       | - |
|             | RA434 Syn4      | 2               | 43            | 35     | 81%             | 8      | 19%     | 0 |
| RABN23 Syn3 | 8               | 78              | 66            | 85%    | 8               | 10%    | 4       |   |
| n           |                 | 13              | 13            | 13     | 13              | 13     | 13      |   |

#### 4.1.7 Auswertung der Korrelationsanalysen

Die klinischen Daten der Patienten, deren Gewebe im Rahmen der IF-Färbungen zu jedem einzelnen Tetraspanin ausgewertet wurden, wurden auf möglicherweise bestehende Korrelationen in den Ergebnissen zu den Beurteilungskategorien der IF-Färbungen untersucht. Es wurden Korrelationsanalysen, wie im Methodenteil beschrieben (s. Kapitel 3.11.1.2), durchgeführt. Ebenfalls wurden die Ergebnisse der verschiedenen Tetraspanine im Vergleich auf mögliche Korrelationen geprüft. Da sich in vorherigen statistischen Analysen keine signifikanten Unterschiede zwischen den OA-

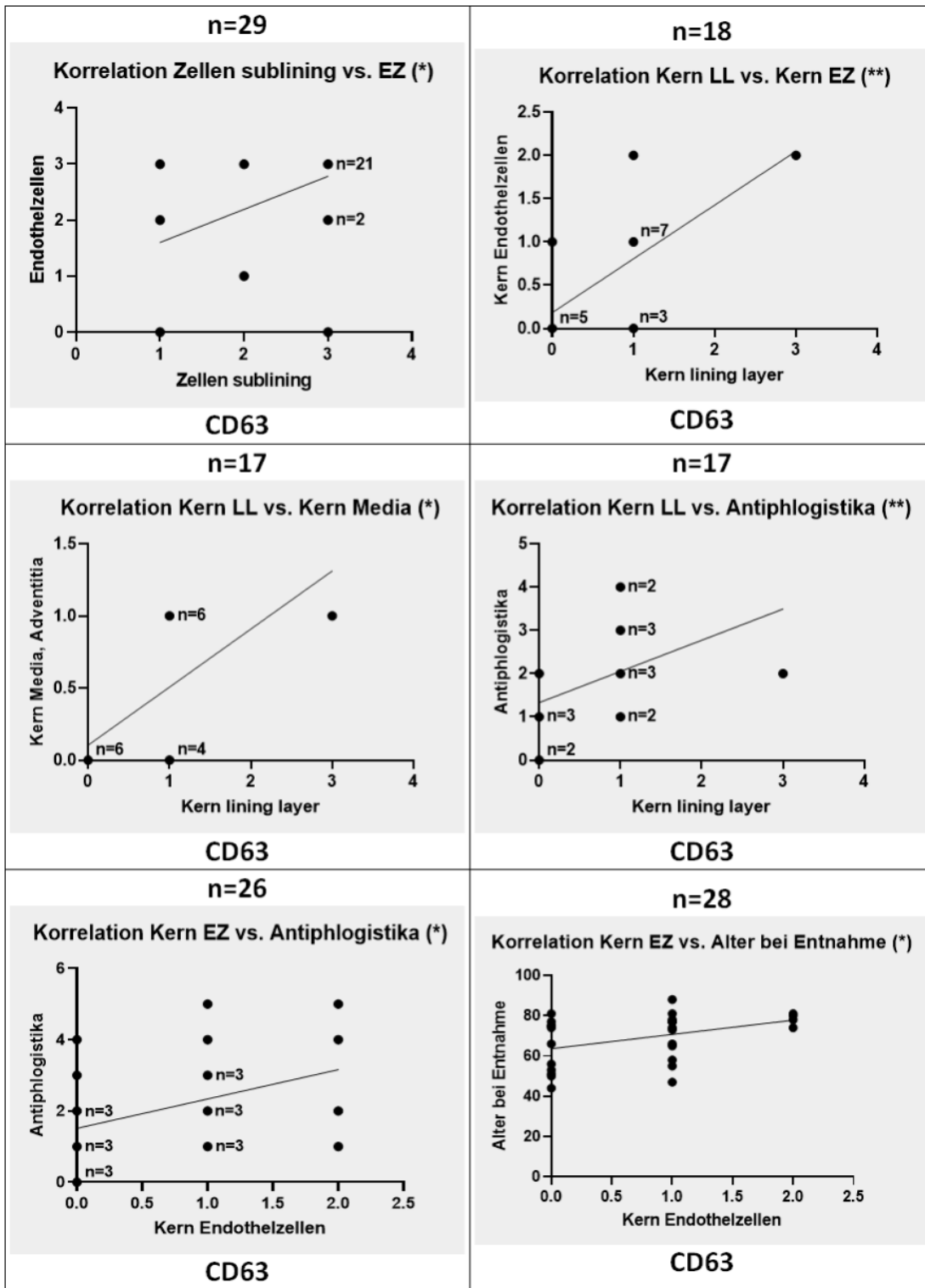
und RA-Gruppen der einzelnen Tetraspanine zeigten, wurden die OA- und RA-Gewebeproben für diese statistische Analyse, wenn nicht anders angegeben, zusammengeführt. Ergaben Korrelationen zwischen zwei Bewertungskategorien eine Signifikanz (s. Tab. 48), wurden sie graphisch dargestellt (s. Abb. 26 bis Abb. 29).

**Tab. 48: Als signifikant berechnete Korrelationen zwischen Immunfluoreszenz-Auswertungskategorien**

Es wurde ein multipler Korrelationstest nach Spearman für Kategorien der Immunfluoreszenz-Auswertung durchgeführt. Hierfür wurden die Gewebeproben der OA- und RA-Gruppe zusammengeführt. Angegeben sind Stichprobenumfang und Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman. Die Stichproben sind auf dem Signifikanzniveau von 0,05 (\*), 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*) signifikant. (Kern (Kernmuster), FB (Fibroblasten), EZ (Endothelzellen), LL (lining layer)).

| Korrelationen   | n  | r <sub>s</sub> -Wert |
|---|----|----------------------|
| <b>CD63</b>   |    |                      |
| Zellen des <i>sublinings</i> vs. EZ                                   | 29 | 0,46*                |
| Kernmuster LL vs. Kernmuster EZ                                       | 18 | 0,62**               |
| Kernmuster LL vs. Kernmuster Media/Adventitia                         | 17 | 0,65*                |
| Kernmuster LL vs. Antiphlogistika                                     | 17 | 0,62**               |
| Kernmuster EZ vs. Antiphlogistika                                     | 26 | 0,40*                |
| Kernmuster EZ vs. Alter bei Gewebeentnahme                            | 28 | 0,41*                |
| <b>CD81</b>   |    |                      |
| Zellen des <i>sublinings</i> vs. LL                                   | 30 | 0,45*                |
| <b>CD151</b>  |    |                      |
| Kernmuster LL vs. Kernmuster EZ                                       | 24 | 0,44*                |
| Kernmuster LL vs. Kernmuster Media/Adventitia                         | 23 | 0,44*                |
| Kernmuster EZ vs. Kernmuster Media/Adventitia                         | 29 | 1,00***              |
| Kernmuster Zellen <i>sublining</i> vs. Zellausläufer <i>sublining</i> | 30 | 0,44*                |
| Kernmuster Zellen <i>sublining</i> vs. Antiphlogistika                | 27 | 0,45*                |
| starke Färbung Endothel vs. Entnahmedatum                             | 29 | -0,49**              |
| <b>Vergleich der Tetraspanine</b>                                     |    |                      |
| CD63 vs. CD81 (OA und RA)   | 5  | 0,97*                |
| CD63 vs. CD151 (nur OA)   | 10 | 0,72*                |

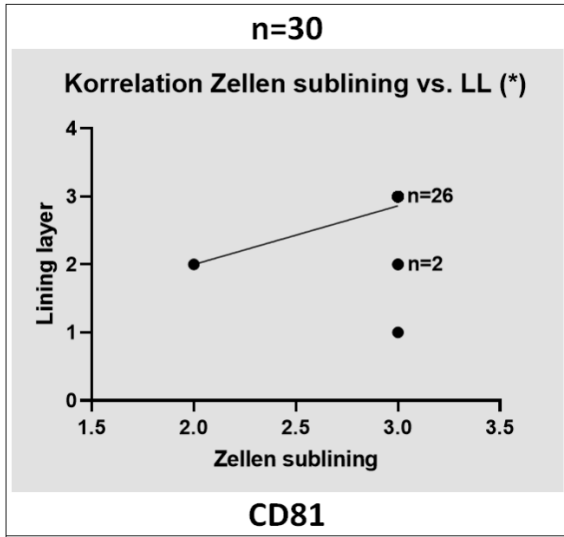
Für die Ergebnisse der Immunfluoreszenz von CD63 wurden sechs Korrelationen definiert (s. Abb. 26). Bei allen Korrelationen konnte eine positive Steigung der Regressionsgeraden mit r<sub>s</sub> zwischen 0,40 und 0,65 ermittelt werden.



**Abb. 26: Als signifikant berechnete Korrelationen zwischen Immunfluoreszenz-Auswertungskategorien für CD63**

Es wurde ein multipler Korrelationstest nach Spearman für Kategorien der Immunfluoreszenz-Auswertung durchgeführt. Hierfür wurden die Gewebeproben der OA- und RA-Gruppe zusammengeführt. Bis auf die Kategorien Antiphlogistika (Anzahl der eingenommenen Präparate) und Alter bei Entnahme (Patientenalter) sind die Score-Werte der unterschiedlichen Immunfluoreszenz-Auswertungskategorien aufgetragen. Die Stichproben sind auf dem Signifikanzniveau von 0,05 (\*), 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*) signifikant. (Kern (Kernmuster), FB (Fibroblasten), EZ (Endothelzellen), LL (*lining layer*)).

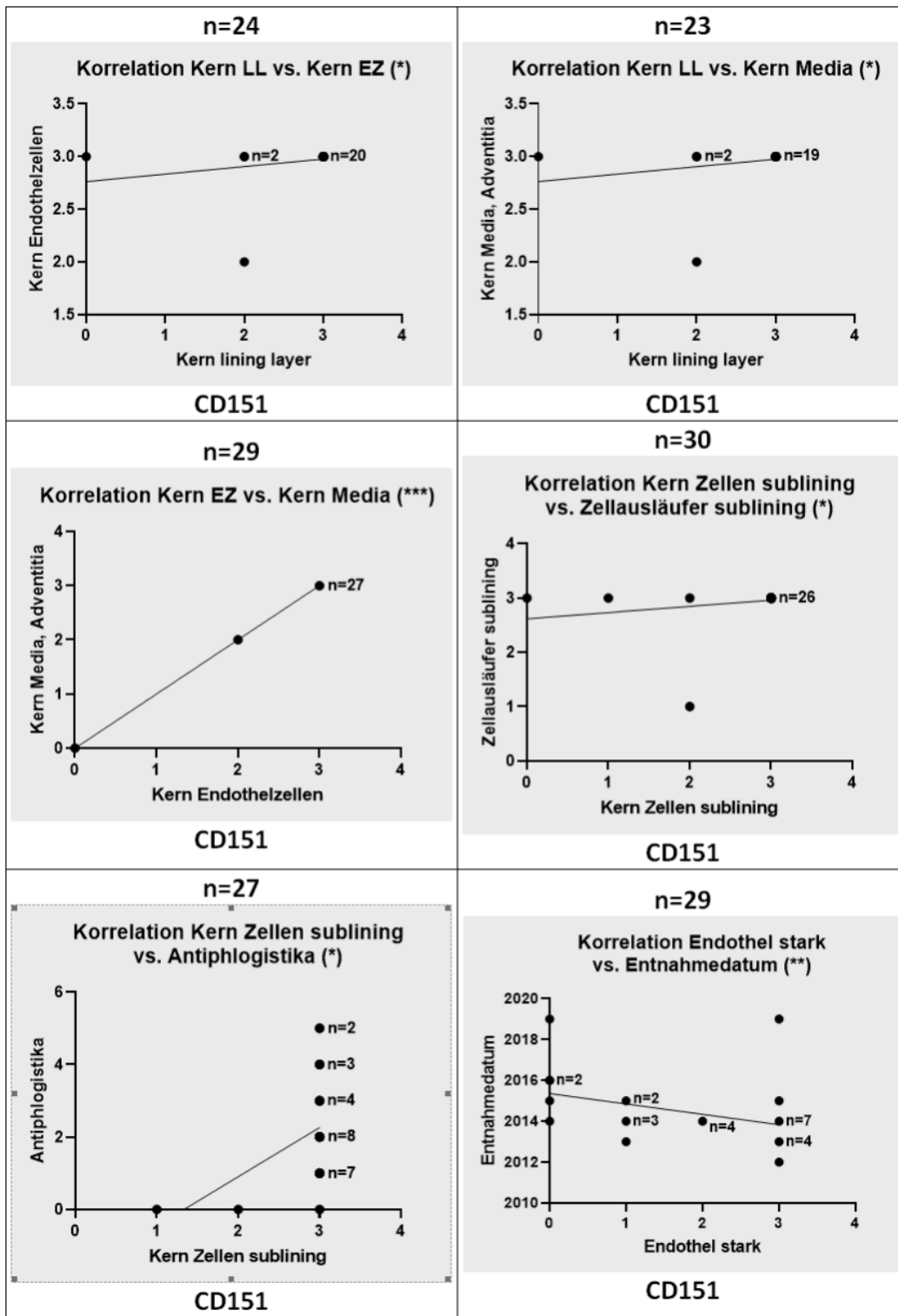
Weiterhin ergab die Korrelationsanalyse für das Tetraspanin CD81 eine signifikante Korrelation zwischen der Gruppe Zellen des *sublinings* vs. LL mit einem Stichprobenumfang von 30 Geweben (s. Abb. 27). Die Regressionsgerade wies eine positive Steigung mit  $r_s=0,45$  auf.



**Abb. 27: Als signifikant berechnete Korrelationen zwischen Immunfluoreszenz-Auswertungskategorien für CD81**

Es wurde ein multipler Korrelationstest nach Spearman für Kategorien der Immunfluoreszenz-Auswertung durchgeführt. Hierfür wurden die Gewebeproben der OA- und RA-Gruppe zusammengeführt. Bis auf die Kategorien Antiphlogistika (Anzahl der eingenommenen Präparate) und Alter bei Entnahme (Patientenalter) sind die Score-Werte der unterschiedlichen Immunfluoreszenz-Auswertungskategorien aufgetragen. Die Stichproben sind auf dem Signifikanzniveau von 0,05 (\*), 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*) signifikant. (Kern (Kernmuster), FB (Fibroblasten), EZ (Endothelzellen), LL (*lining layer*)).

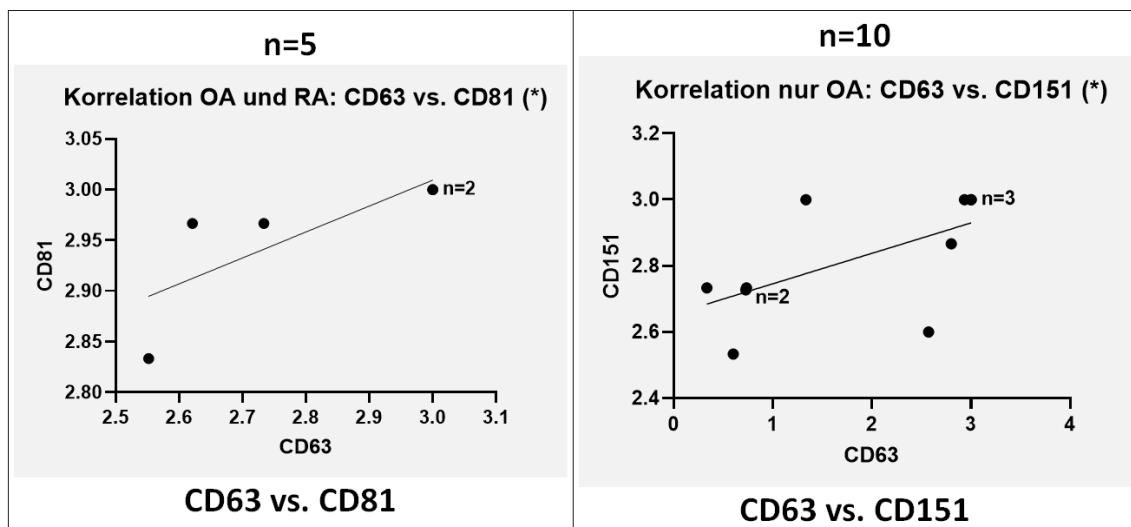
Für das Tetraspanin CD151 ergaben sich sechs signifikante Korrelationen (s. Abb. 28). Bei fünf von sechs Korrelationen fand sich eine Regressionsgerade mit positiver Steigung bei  $r_s$  zwischen 0,44 und 1,00. Die Korrelation starke Färbung Endothel vs. Entnahmedatum bildete durch eine Regressionsgerade mit negativer Steigung ( $r_s=-0,49$ ) eine Ausnahme.



**Abb. 28: Als signifikant berechnete Korrelationen zwischen Immunfluoreszenz-Auswertungskategorien für CD151**

Es wurde ein multipler Korrelationstest nach Spearman für Kategorien der Immunfluoreszenz-Auswertung durchgeführt. Hierfür wurden die Gewebeprobe der OA- und RA-Gruppe zusammengeführt. Bis auf die Kategorien Antiphlogistika (Anzahl der eingenommenen Präparate) und Entnahmedatum (Jahreszahl) sind die Score-Werte der unterschiedlichen Immunfluoreszenz-Auswertungskategorien aufgetragen. Die Stichproben sind auf dem Signifikanzniveau von 0,05 (\*), 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*) signifikant. (Kern (Kernmuster), FB (Fibroblasten), LL (*lining layer*), EZ (Endothelzellen)).

Bei den Korrelationsanalysen zum Vergleich der Tetraspanine (s. Abb. 29) zeichneten sich die Konstellationen CD63 vs. CD81 (OA und RA) und CD63 vs. CD151 (nur OA) mit einer positiven Steigung der Regressionsgeraden aus. Für die Korrelation CD63 vs. CD81 (OA und RA) konnten die fünf Hauptkategorien LL, EZ, Media/Adventitia, Zellen des *sublinings* und Infiltrate eingeschlossen werden ( $r_s=0,97$ ). Bei der Korrelation CD63 vs. CD151 (nur OA) konnten zusätzlich zu den Kategorien LL, EZ, Media/Adventitia, Zellen des *sublinings* und Infiltrate die weitere Kategorie des Kernmusters berücksichtigt werden. Insgesamt wurden zehn Kategorien einbezogen ( $r_s=0,72$ ).



**Abb. 29: Als signifikant berechnete Korrelationen zwischen Immunfluoreszenz-Auswertungskategorien für den Vergleich zwischen den einzelnen Tetraspaninen**

Es wurde ein multipler Korrelationstest nach Spearman für die arithmetischen Mittelwerte der Immunfluoreszenz-Auswertungskategorien durchgeführt. Hierfür wurden die Gewebeproben der OA- und RA-Gruppe (wenn nicht anders angegeben) zusammengeführt. Auf den Achsen wurden die Score-Werte für die unterschiedlichen Immunfluoreszenz-Auswertungskategorien aufgetragen. Die Stichproben sind auf dem Signifikanzniveau von 0,05 (\*), 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*) signifikant.

## 4.2 Fibroblastenstimulierung mit proentzündlichen Stimuli

Zur Untersuchung der Expression der Tetraspanine CD63, CD81 und CD151 in synovialen Fibroblasten nach Aktivierung durch Entzündungsfaktoren wurden Zellkulturen mit anschließender Real-Time-PCR durchgeführt.

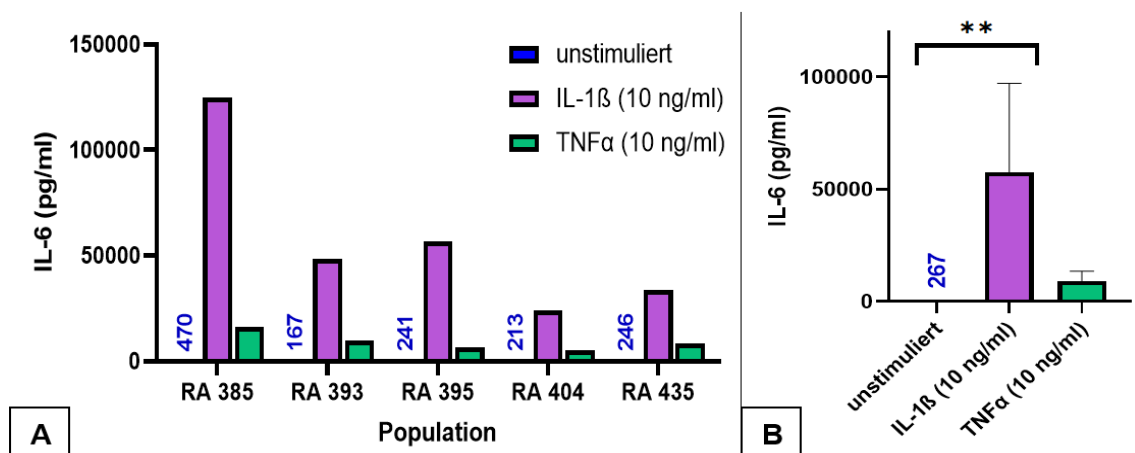
Die Zellkultur-Ansätze wurden mit fünf RASF- und fünf OASF-Populationen durchgeführt. Eingesetzt wurden verschiedene pro-inflammatorische Zytokine unter zwei verschiedenen Stimulationszeiten (s. Kapitel 3.6).

### 4.2.1 Verifikation der proentzündlichen Reaktion der RASF

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Stimulierung wurde für die Zellüberstände der 17-stündig stimulierten RASF ein Festphasen-Sandwich-ELISA für humanes IL-6

durchgeführt. Dabei wurde die Serumkonzentration von IL-6 für die Stimulierungsansätze mit IL- $\beta$ 1 und TNF $\alpha$  sowie der unstimulierten Kultur gemessen. Die gemessenen IL-6-Konzentrationen wurden graphisch ausgewertet und sowohl für die einzelnen RASF-Populationen als auch für die errechneten arithmetischen Mittelwerte der fünf Populationen mit Standardabweichungen dargestellt (s. Abb. 30). Verglichen wurden die mit den proentzündlichen Faktoren IL- $\beta$ 1 oder TNF $\alpha$  stimulierten RASF mit einer unstimulierten RASF-Kultur. Es zeigte sich eine erfolgreiche IL-6-Induktion durch IL- $\beta$ 1 und TNF $\alpha$ , wobei sich für TNF $\alpha$  schwächere Konzentrationen ergab. Eine Population fiel mit einer verglichen mit den anderen Populationen deutlich höheren Induktion durch IL- $\beta$ 1 und auch TNF $\alpha$  auf.

Der durchgeführte multiple Vergleichstest nach Dunnett ergab für den Vergleich der IL- $\beta$ 1 stimulierten RASF mit der unstimulierten RASF-Kultur einen signifikanten Unterschied ( $p=0,006$ ). Für den Vergleich der TNF $\alpha$  stimulierten RASF mit der unstimulierten RASF-Kultur resultierte kein signifikanter Unterschied ( $p=0,750$ ).



**Abb. 30: IL-6-Expression der RASF-Populationen nach Stimulierung**

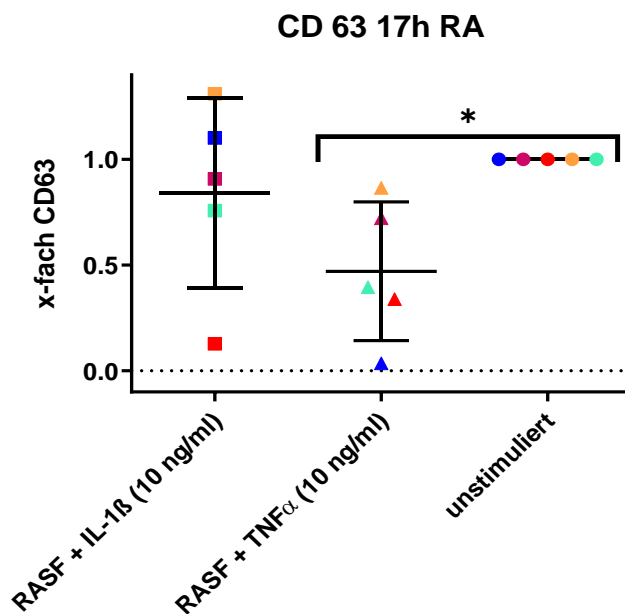
**A:** Dargestellt sind die mittels ELISA quantifizierte IL-6-Konzentrationen (pg/ml) für die einzelnen RASF-Populationen nach Stimulierung durch IL- $\beta$ 1 und TNF $\alpha$ . Gezeigt sind die Populationen der unterschiedlichen Stimulationsgruppen, bei denen die RASF entweder mit IL- $\beta$ 1 (10 ng/ml) oder mit TNF $\alpha$  (10 ng/ml) für 17 h stimuliert wurden. Unstimulierte RASF-Kulturen wurden jeweils zur Kontrolle mitgeführt und zeigten im Vergleich zu stimulierten Populationen eine nur minimale IL-6-Expression. **B:** Anhand der einzelnen RASF-Populationen wurden die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichungen für die Stimulationsgruppen IL- $\beta$ 1, TNF $\alpha$  und der unstimulierten Kulturen berechnet und dargestellt. Der Stichprobenumfang pro Gruppe umfasst fünf RASF-Populationen. Die Stichproben sind auf dem Signifikanzniveau von 0,05 (\*), 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*) signifikant.

#### 4.2.2 Analyse des Tetraspaninexpressionsprofils

Nach der erfolgreichen Stimulierung wurden die Zelllysate der verschiedenen Zellkultur-Ansätze einer reversen Transkription zugeführt. Dafür wurde zunächst die RNA isoliert und daraufhin mittels reverser Transkription cDNA synthetisiert, welche als Template für die anschließende Real-Time-PCR verwendet werden konnte.

#### 4.2.2.1 Auswertung der CD63-Expression

Für die Real-Time-PCR wurden zunächst für 17 Stunden mit IL- $\beta$ 1 oder TNF $\alpha$  stimulierte Fibroblasten von fünf Patienten mit RA verwendet. Als Kontrolle wurde für jede Population eine unstimulierte RASF-Kultur mitgeführt. Bei der durchgeführten Real-Time-PCR zeigten sich die Wasserkontrollen negativ und die Schmelzkurven regelrecht, sodass die Ergebnisse zur Auswertung herangezogen werden konnten. Ergebnisse wurden graphisch und statistisch ausgewertet (s. 3.10.2.2 Auswertung ) und in Abb. 31 dargestellt.



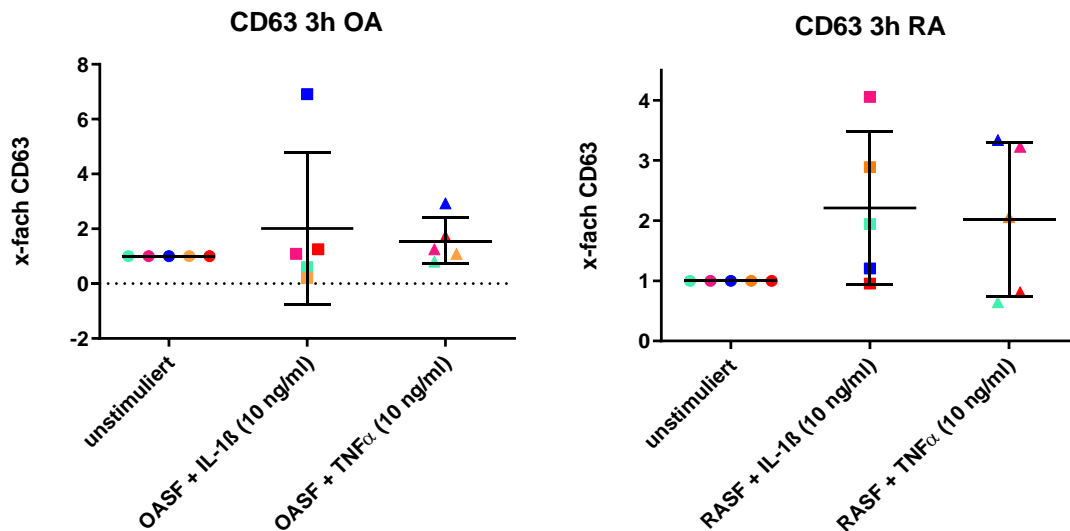
**Abb. 31: CD63-Expression der RASF nach 17-stündiger Stimulierung**

Dargestellt ist die x-fache CD63-Expression der mit verschiedenen proentzündlichen Faktoren für 17 h stimulierten RASF-Populationen, bezogen auf die entsprechende unstimulierte Kontrollkultur (auf Basis 1 gesetzt). Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für die Stimulationsgruppen IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und der unstimulierten Kulturen berechnet. Jeder einzelnen Population wurde zur Identifikation eine Farbe zugewiesen. Es wurde ein multipler Vergleichstest nach Dunn durchgeführt. Die Stichproben sind auf dem Signifikanzniveau von 0,05 (\*), 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*) signifikant unterschiedlich. Der Stichprobenumfang pro Gruppe umfasst n=5 RASF-Populationen.

Es zeigte sich in der Gruppe der IL-1 $\beta$  stimulierten RASF eine im Mittel 0,84-fach reduzierte CD63-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kultur. Für die Gruppe der TNF $\alpha$  stimulierten RASF ergaben sich im Bezug zur unstimulierten RASF-Kultur für alle Populationen reduzierte CD63-Expressionen. Es resultierte eine im Mittel 0,47-fache CD63-Expression.

Die One-Way ANOVA Analyse nach Kruskal-Wallis wies eine Signifikanz auf. Der anschließend durchgeführte multiple Vergleichstest nach Dunn ergab für den Vergleich der TNF $\alpha$  stimulierten RASF mit der unstimulierten RASF-Kultur einen signifikanten Unterschied ( $p=0,0352$ ).

In einem weiteren Zellkultur-Ansatz wurden die RASF- und fünf OASF-Populationen für drei Stunden mit IL- $\beta$ 1 und TNF $\alpha$  stimuliert. Sie wurden einer Real-Time-PCR zugeführt, um eine möglicherweise stattfindende kurzfristige Gegenregulierung aufzudecken. Bei den durchgeführten PCRs zeigten sich die Wasserkontrollen negativ und die Schmelzkurven regelrecht, sodass die Ergebnisse zur Auswertung herangezogen werden konnten. Die Ergebnisse wurden graphisch und statistisch ausgewertet und in Abb. 32 dargestellt.



**Abb. 32: CD63-Expression OASF und RASF nach dreistündiger Stimulierung**

Dargestellt ist die x-fache CD63-Expression der mit verschiedenen proentzündlichen Faktoren für 3 h stimulierten OASF- und RASF-Populationen, bezogen auf die entsprechende unstimulierte Kontrollkultur (auf Basis 1 gesetzt). Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für die Stimulationsgruppen IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und der unstimulierten Kulturen berechnet. Jeder einzelnen Population wurde zur Identifikation eine Farbe zugewiesen. Der Stichprobenumfang pro Gruppe umfasst n=5 OASF- bzw. RASF-Populationen.

In der Gruppe der IL-1 $\beta$  stimulierten OASF zeigte sich ein arithmetischer Mittelwert einer 2,01-fach erhöhten CD63-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kultur. Eine Population (Abb. 32, blaue Punkte) wies eine viel höhere Expression im Vergleich zu den anderen Populationen auf. Für diese Population zeigte sich auch in der Stimulierung mit TNF $\alpha$  der höchsten CD63-Expressionswert. Bei dieser Stimulierung wiesen die meisten Populationen eine höhere Expression im Bezug zur unstimulierten Kultur auf. Der arithmetische Mittelwert ergab eine 1,56-fache CD63-Expression.

Bei der Betrachtung der stimulierten RASF zeigten sich für die Stimulation mit IL-1 $\beta$  bei einem arithmetischen Mittelwert einer 2,21-fachen CD63-Expression bei den meisten Populationen eine erhöhte CD63-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kultur. Für die TNF $\alpha$  stimulierten RASF konnte ein arithmetischer Mittelwert einer 2,02-fach erhöhten CD63-Expression im Bezug zur unstimulierten Kultur verzeichnet werden.

Die durchgeführte One-Way ANOVA Analyse nach Kruskal-Wallis ergab sowohl für die

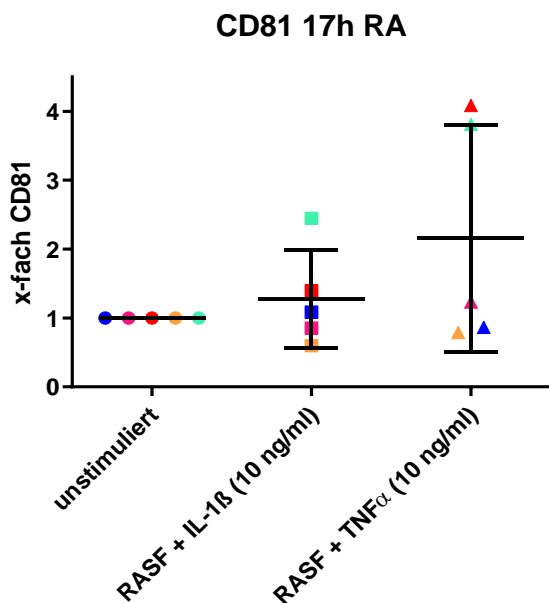
OASF als auch für die RASF für die dreistündige Stimulierung keine signifikanten Unterschiede.

Die Expression des Tetraspanin CD63 erschien nach dreistündiger Stimulierung bei den RASF-Populationen leicht hochreguliert zu sein. Nach 17-stündiger Stimulierung war diese Erhöhung bereits nicht mehr sichtbar, sodass eine Gegenregulation vermutet wurde. Dies wies auf eine Zeitkinetik hin, welche durch einen Kurzzeiteffekt, der sich gegenreguliert, charakterisiert ist. Die Gruppe der OASF schienen keine Unterschiede in der CD63-Expression aufzuweisen.

#### 4.2.2.2 Auswertung der CD81-Expression

Für die Real-Time-PCR wurden zunächst für 17 Stunden mit IL- $\beta$ 1 oder TNF $\alpha$  stimulierte Fibroblasten von fünf Patienten mit RA verwendet. Als Kontrolle wurde für jede Population eine Kultur unstimulierter RASF mitgeführt.

Bei der durchgeführten PCR zeigten sich die Wasserkontrolle negativ und die Schmelzkurven regelrecht, sodass die Ergebnisse zur Auswertung herangezogen werden konnten. Ergebnisse der PCR wurden graphisch und statistisch ausgewertet (s. Kapitel 3.10.2.2) und in Abb. 33 dargestellt.



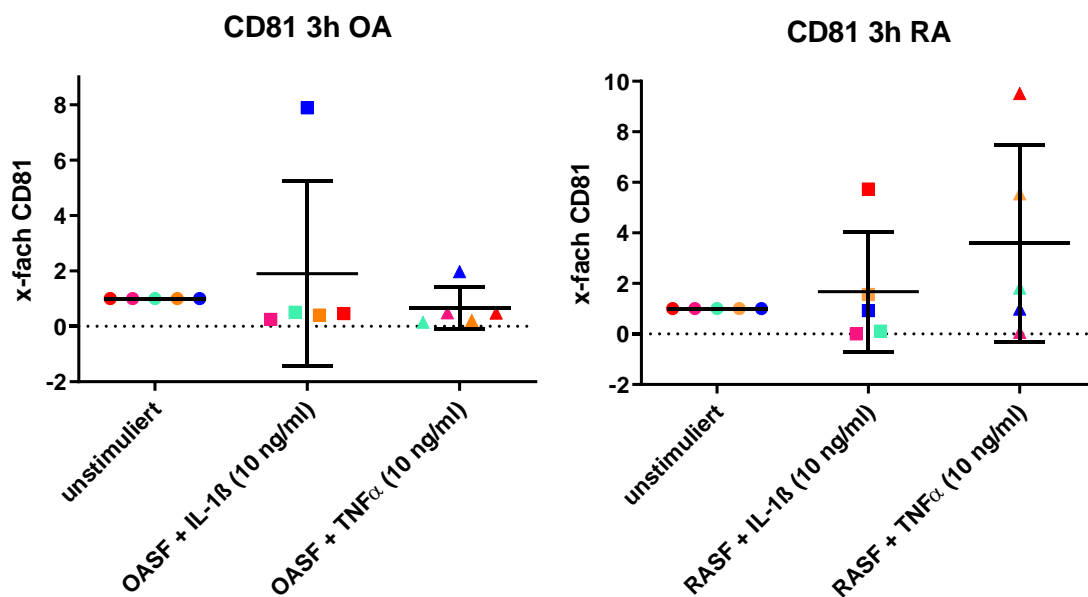
**Abb. 33: CD81-Expression RASF nach 17-stündiger Stimulierung**

Dargestellt ist die x-fache CD81-Expression der mit verschiedenen proentzündlichen Faktoren für 17 h stimulierten RASF-Populationen, bezogen auf die entsprechende unstimulierte Kontrollkultur (auf Basis 1 gesetzt). Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für die Stimulationsgruppen IL- $\beta$ 1, TNF $\alpha$  und der unstimulierten Kulturen berechnet. Jeder einzelnen Population wurde zur Identifikation eine Farbe zugewiesen. Der Stichprobenumfang pro Gruppe umfasst n=5 RASF-Populationen.

Für die IL- $\beta$ 1 stimulierten RASF ließ sich ein arithmetischer Mittelwert einer 1,28-fach erhöhten CD81-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kultur erkennen. In der

Gruppe der TNF $\alpha$  stimulierten RASF ergab sich ein arithmetischer Mittelwert einer 2,16-fach erhöhten CD81-Expression in Bezug zu der mitgeführten unstimulierten RASF-Kultur.

In einem weiteren Zellkultur-Ansatz wurden die RASF- und außerdem fünf OASF-Populationen von fünf Patienten mit OA für nur drei Stunden mit IL- $\beta$ 1 und TNF $\alpha$  stimuliert. Sie wurden einer Real-Time-PCR zugeführt, um eine möglicherweise stattfindende Gegenregulierung aufzudecken. Bei den durchgeführten PCRs zeigten sich die Wasserkontrollen negativ und die Schmelzkurven regelrecht, sodass die Ergebnisse zur Auswertung herangezogen werden konnten. Die Ergebnisse wurden graphisch und statistisch ausgewertet und in Abb. 34 dargestellt.



**Abb. 34: CD81-Expression OASF und RASF nach dreistündiger Stimulierung**

Dargestellt ist die x-fache CD81-Expression der mit verschiedenen proentzündlichen Faktoren für 3 h stimulierten OASF- und RASF-Populationen, bezogen auf die entsprechende unstimulierte Kontrollkultur (auf Basis 1 gesetzt). Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für die Stimulationsgruppen IL- $\beta$ 1, TNF $\alpha$  und der unstimulierten Kulturen berechnet. Jeder einzelnen Population wurde zur Identifikation eine Farbe zugewiesen. Der Stichprobenumfang pro Gruppe umfasst n=5 OASF- bzw. RASF-Populationen.

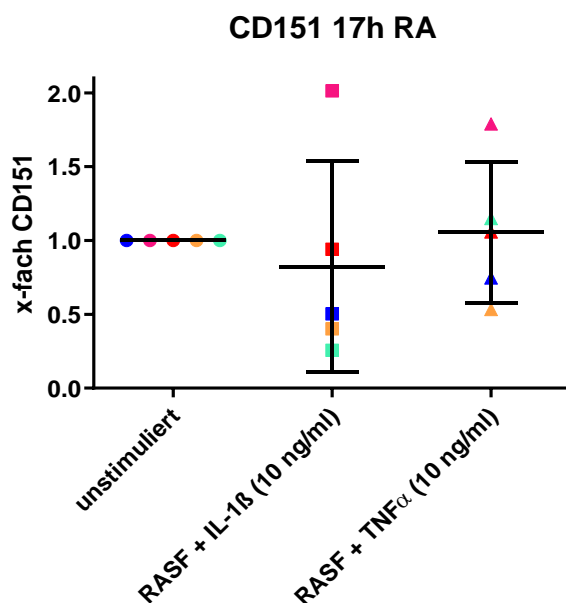
Für OASF, welche für 3 h mit IL- $\beta$ 1 stimuliert wurden, ergab sich ein arithmetischer Mittelwert einer 1,90-fach erhöhten CD81-Expression verglichen mit der unstimulierten Kultur. Dabei zeigten die meisten Populationen jedoch eine reduzierte CD81-Expression und nur eine Population eine starke Erhöhung im Bezug zur unstimulierten OASF-Kultur. Diese Population stellte auch in der Gruppe der TNF $\alpha$  stimulierten OASF die einzige Population mit einer erhöhten CD81-Expression dar. Vier weitere Populationen dieser Gruppe mit einem arithmetischen Mittelwert einer 0,66-fachen CD81-Expression zeigten eine Reduktion der CD81-Expression im Vergleich zur unstimulierten OASF-Kultur.

Wurden die RASF bei dreistündiger Stimulierung mit IL-1 $\beta$  betrachtet, konnte ein arithmetischer Mittelwert einer 1,67-fach erhöhten CD81-Expression im Vergleich zu der unstimulierten Kultur beobachtet werden. Für die Population mit der 5,74-fachen Expression, ließ sich auch bei der Stimulierung mit TNF $\alpha$  die höchste CD81-Expression verzeichnen. Die Stimulierung mit TNF $\alpha$  wies einen arithmetischen Mittelwert einer 3,59-fach erhöhten CD81-Expression auf.

Die durchgeführte One-Way ANOVA Analyse nach Kruskal-Wallis ergab keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppen der OASF und RASF wiesen keine Unterschiede in der CD81-Expression auf.

#### 4.2.2.3 Auswertung der CD151-Expression

Für die Real-Time-PCR wurden zunächst für 17 Stunden mit IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  stimulierte Fibroblasten von fünf Patienten mit rheumatoider Arthritis verwendet. Als Kontrolle wurde für jede Population eine unstimulierte RASF-Kultur mitgeführt. Bei der durchgeführten PCR zeigten sich die Wasserkontrolle negativ und die Schmelzkurven regelrecht, sodass die Ergebnisse zur Auswertung herangezogen werden konnten. Ergebnisse der PCR wurden graphisch und statistisch ausgewertet (s. 3.10.2.2 Auswertung ) und in Abb. 35 dargestellt.

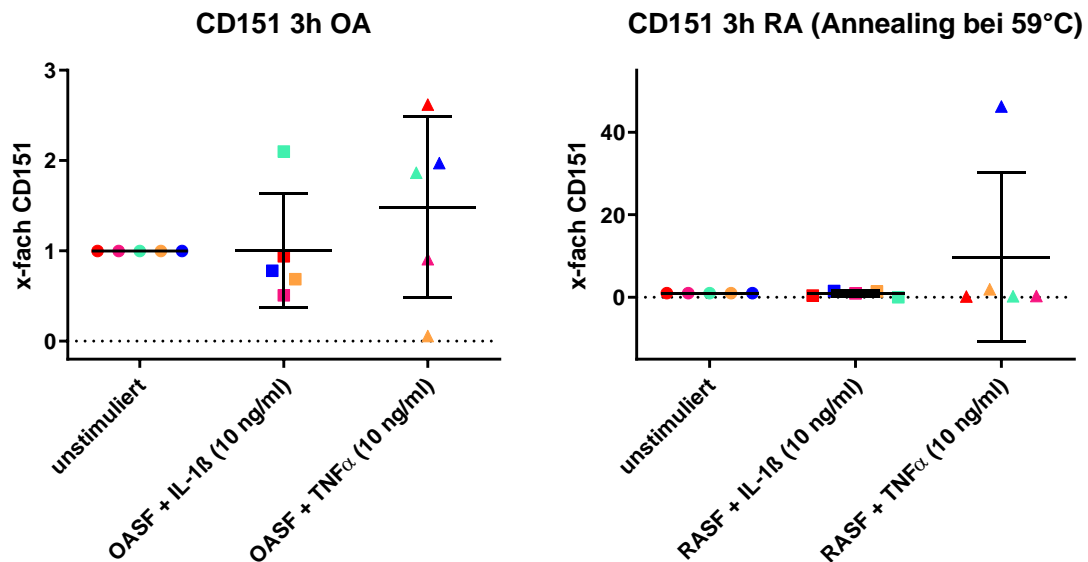


**Abb. 35: CD151-Expression RASF nach 17-stündiger Stimulierung**

Dargestellt ist die x-fache CD151-Expression der mit verschiedenen proentzündlichen Faktoren für 17 h stimulierten RASF-Populationen, bezogen auf die entsprechende unstimulierte Kontrollkultur (auf Basis 1 gesetzt). Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für die Stimulationsgruppen IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und der unstimulierten Kulturen berechnet. Jeder einzelnen Population wurde zur Identifikation eine Farbe zugewiesen. Der Stichprobenumfang pro Gruppe umfasst n=5 RASF-Populationen.

Für IL-1 $\beta$  stimulierte RASF zeigten sich bei einem arithmetischen Mittelwert einer 0,82-fachen CD151-Expression die meisten Populationen mit einer reduzierten CD151-Expression im Vergleich zur unstimulierten RASF-Kultur. Die Gruppe der TNF $\alpha$  stimulierten RASF wies einen arithmetischen Mittelwert einer 1,06-fach erhöhten CD151-Expression im Bezug zur unstimulierten Kultur auf.

In einem weiteren Zellkultur-Ansatz wurden die RASF- und außerdem fünf OASF-Populationen von fünf Patienten mit OA für nur drei Stunden mit IL- $\beta$ 1 und TNF $\alpha$  stimuliert. Sie wurden einer Real-Time-PCR zugeführt, um eine möglicherweise stattfindende Gegenregulierung aufzudecken. Bei den durchgeführten PCRs zeigten sich die Wasserkontrollen negativ und die Schmelzkurven regelrecht, sodass die Ergebnisse zur Auswertung herangezogen werden konnten. Die Ergebnisse wurden graphisch und statistisch ausgewertet und in Abb. 36 dargestellt.



**Abb. 36: CD151-Expression OASF und RASF nach dreistündiger Stimulierung**

Dargestellt ist die x-fache CD151-Expression der mit verschiedenen proentzündlichen Faktoren für 3 h stimulierten OASF- und RASF-Populationen, bezogen auf die entsprechende unstimulierte Kontrollkultur (auf Basis 1 bzw. 0 gesetzt). Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für die Stimulationsgruppen IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und der unstimulierten Kulturen berechnet. Jeder einzelnen Population wurde zur Identifikation eine Farbe zugewiesen. Der Stichprobenumfang pro Gruppe umfasst n=5 OASF- bzw. RASF-Populationen.

In der Gruppe der mit IL-1 $\beta$  dreistündig stimulierten OASF ließen sich bei einem arithmetischen Mittelwert einer 1,00-fachen CD151-Expression die meisten Populationen mit einer reduzierten CD151-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kultur erkennen. Für die Stimulierung mit TNF $\alpha$  zeigte sich ein arithmetischer Mittelwert einer 1,49-fach erhöhten CD151-Expression im Bezug zur unstimulierten OASF-Kultur. Die mit IL-1 $\beta$  dreistündig stimulierten RASF wiesen einen arithmetischen Mittelwert einer

0,87-fach reduzierten CD151-Expression im Vergleich zur unstimulierten RASF-Kultur auf. Für die TNF $\alpha$  stimulierten RASF ergab sich ein arithmetischer Mittelwert einer 9,79-fach erhöhten CD151-Expression im Bezug zur unstimulierten RASF-Kultur. Dabei wies eine Population mit einer 46,21-fachen Erhöhung der CD151-Expression eine sehr große Differenz zu allen anderen Stimulationsversuchen auf.

Die durchgeführte One-Way ANOVA Analyse nach Kruskal-Wallis ergab keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppen der OASF und RASF wiesen keine Unterschiede in der CD151-Expression auf.

## 5. DISKUSSION

In den vergangenen Jahren konnten in der molekularmedizinischen und immunologischen Forschung zahlreiche neue Aspekte bezüglich der Pathophysiologie der RA aufgedeckt werden. Dennoch ist der Entstehungsprozess der RA weiterhin nicht umfassend aufgedeckt. Auch sind viele Vorgänge der Progression der RA noch nicht ausreichend verstanden. Ein bedeutender Aspekt bei der Progression der Erkrankung kommt der Migrationsfähigkeit inflammatorischer und Matrix-zerstörender Zellen sowie der Ausbreitung auf gesunde Gelenke und extraartikulären Manifestationen zu [10, 29, 108]. Dieses Verhalten von schädigenden Zellen ist auch bei Vorgängen der Tumormetastasierung bekannt [109, 110]. Im Rahmen der Tumorforschung wurden bezüglich einer Beteiligung an diesem Prozess bereits einige Mitglieder der Tetraspanin-Familie untersucht [41]. Dabei zeigten Tetraspanine sowohl pro-metastatische als auch supprimierende Eigenschaften bei unterschiedlichen Tumorerkrankungen [34, 41]. Gerade durch ihre Fähigkeit über Tetraspanin-angereicherte Mikrodomänen die Zellmembran und ihre Proteine zu organisieren, gewinnen Tetraspanine eine große Bedeutung bei zellulären Prozessen und Interaktionen wie der Signaltransduktion [27, 38], Zellproliferation, -differenzierung und -migration [27, 33, 38]. Involviert sind in solchen Clustern verschiedene Adhäsionsmoleküle, Signalrezeptoren und Immunglobuline [27, 38]. Auch Interaktionen zwischen verschiedenen Mitgliedern der Tetraspanin-Familie sind dabei zu beobachten [27, 44–46]. Eine spezifische Bindung an Laminin-bindende Integrine ist für die Adhäsion, Migration und Signalübertragung in Zellen von Bedeutung [73, 97]. Denn entscheidend für den Kontakt von Zellen im für sie vorgesehenen Zellverband und der Zellbewegung sind Adhäsionsmoleküle wie Integrine. Eine korrekte Adhäsion kann zudem Einfluss auf die Funktion einer Zelle und deren Zellteilung nehmen [19, 21]. So wurde ein Einfluss von Wechselwirkungen der Integrine bei T-Zellen auf intrazelluläre Signalwege wie Proliferation, Apoptose, Sekretion von Enzymen oder Zytokinen, Migration sowie zellulärer Invasion beobachtet [20, 23].

Bei der RA konnte diesbezüglich im Synovialgewebe eine Hochregulation von Integrinrezeptoren und ihrer Liganden im Synovialgewebe nachgewiesen werden [23]. Dies führt weiterhin zur Einwanderung weiterer Entzündungszellen wie Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen in das *sublining* [4, 11] sowie zu Gefäßneubildungen [12]. Die Passage von Entzündungszellen durch die Gefäßwand in entzündetes Gewebe wird ebenso durch ein Zusammenspiel verschiedener Adhäsionsmoleküle reguliert.

Beteiligt sind unter anderem E-Selektin, Integrine und CAMs [19]. Eine Wanderung durch das Gefäßsystem ließ sich auch bei RA-synovialen Fibroblasten beobachten [10]. Dabei ist eine Interaktion mit dem E-Selektin der Endothelzellen von entscheidender Bedeutung [26]. Ein solches Zusammenspiel mit Integrinen und die damit ermöglichte Wanderung durch Gewebe ist ebenso für metastasierende Tumorzellen bekannt [19]. In diesem Zusammenhang konnte eine dysregulierte Integrinexpression in diesen Zellen nachgewiesen werden [23].

Führt man die Überlegung dahin zurück, dass Tetraspanine die Organisation und Aktivität dieser Integrine beeinflussen, lässt dies die Vermutung zu, dass Tetraspanine auch in der Pathogenese der RA eine wichtige Rolle einnehmen könnten. In vorausgegangenen Studien unseres Forschungslabors wurde bereits das Tetraspanin CD82 in RA-synovialen Fibroblasten im Vergleich zu OASF untersucht. Dabei zeigte sich eine erhöhte Expression bei RASF in Kultur. Im Synovium konnte ebenfalls eine vermehrte Expression in den Bereichen der Gefäße, *lining layer* und der Invasionszone sowie eine verminderte Expression im *sublining* bei der RA beobachtet werden [29]. Diese Beobachtung, zusammen mit funktionellen Untersuchungen an RASF in Kultur, ließ vermuten, dass RASF durch eine vermehrte Expression von CD82 im Bereich der Entzündung und Matrixdestruktion vor Ort gehalten werden [11]. Dies konnte daran gezeigt werden, dass die Motilität der RASF in dieser Arbeit durch Überexpression von CD82 reduziert werden konnte [11]. Da einerseits in Tetraspanin-angereicherten Mikrodomänen verschiedene Tetraspanine miteinander interagieren [27, 44–46] und andererseits eine Beteiligung unterschiedlicher Tetraspanine im Krankheitsgeschehen verschiedener Tumorerkrankungen nachgewiesen wurde [41], war eine genauere Untersuchung der Expression weiterer Tetraspanine bei der RA und insbesondere bei RASF ein attraktiver Ansatz.

## 5.1 Synovialgewebe von Patienten mit RA und OA

Zur Untersuchung der Tetraspaninexpression im Synovium von Patienten mit RA wurden Gewebeproben im Rahmen von Kniegelenkersatz-Operationen in verschiedenen Kliniken entnommen. Durch die Beteiligung verschiedener Kliniken stand eine größere Anzahl an Gewebeproben zur Verfügung. Um mögliche Variationen in der Gewebeentnahme und -verarbeitung zu minimieren, erfolgten die Aufarbeitung der Gewebe und die Zellisolation anhand von Standardprotokollen der Arbeitsgruppe. Die Zellen standen anschließend für die Arbeit in der Gewebe- und Zellbank zur Verfügung. Es waren Differenzen in Diagnostik- und Therapievorgehen der verschiedenen Kliniken zu erwarten. Die Diagnose der RA wird anhand von Befunden aus Anamnese,

klinischem Erscheinungsbild, Veränderungen der Laborwerte und mittels bildgebender Verfahren gestellt. Auch der Verlauf der Erkrankung, welcher sich als äußerst variabel darstellt, beeinflusst die Diagnosefindung [4]. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Diagnose einer RA anhand der Klassifikationskriterien der American College of Rheumatology und die European League against Rheumatism (s. Tab. 1) gestellt wurde und das Therapievorgehen den rheumatologischen Leitlinien entsprach. Dennoch gibt es für die Behandlung der RA verschiedene Ansatzpunkte und Verfahren (s. Kapitel 1.1.5). Die Vermutung liegt nahe, dass aufgrund unterschiedlicher Wirkmechanismen, variabler Dosierung sowie unterschiedlichem Ansprechen auf die Medikamente ein Einfluss auf die Gewebestrukturen im Gelenk besteht. Eine Remission ist im Gewebe durch weniger Infiltrate sowie weniger Expression von Entzündungsmarkern und Vorkommen von Entzündungszellen gekennzeichnet [111]. Weiterhin variierten auch die Dauer der Therapie sowie das Stadium und der Aktivitätsgrad der Erkrankung bei Gewebeentnahme. Die Gewebe wurden im Rahmen von Eingriffen zum Gelenkersatz entnommen und stellen somit ein fortgeschrittenes Stadium der Gelenkerosion dar. Um mögliche Einflüsse nachvollziehen zu können, wurden alle verfügbaren Daten zu klinischen Angaben wie Stadium, Aktivitätsgrad und Therapie zu den Geweben erhoben und die Ergebnisse der Tetraspaninexpression auf einen möglichen Einfluss durch die beschriebenen Faktoren so weit wie möglich beurteilt. Das Ansprechen auf die angewendeten Therapien und deren Auswirkungsgrad auf das Gewebe konnten jedoch nicht mit der Tetraspaninexpression verglichen werden. Aus den geschilderten Gründen können bestehende Einflüsse auf die Ergebnisse der Tetraspaninexpression durch Medikation, Ansprechen und Stadium der Gelenkerosion nicht ausgeschlossen werden, zumal sich das Krankheitsbild der RA als sehr variabel darstellt [4].

Als Vergleichsgruppe zu den RA-Geweben diente Gewebe von Patienten mit Arthrose und damit per definitionem kein gesundes Gewebe. Da es sich um eine invasive Probengewinnung im Rahmen von Gelenkersatz-Operationen handelte, war eine gesunde Kontrollgruppe auch nicht realisierbar. OA-Gewebe wurde aufgrund der primär degenerativen Ursache der Erkrankung gewählt und stellt in der Regel auch die allgemein anerkannte Kontrollentität für die RA dar. Eine autoimmune Beteiligung liegt bei der Arthrose nicht vor. Im Rahmen der OA kann jedoch ebenfalls eine sekundär durch Belastung und Gelenkerosion induzierte Entzündung im Gewebe auftreten. Es finden sich Entzündungszeichen mit Überwärmung, Druckschmerzhaftigkeit und einem Gelenkerguss mit Schwellung [1], insbesondere bei fortgeschrittenen Stadien, die letztendlich zum Gelenkersatz führen. Ein medikamentöser Einfluss ist auch für

OA-Gewebe zu berücksichtigen, wobei die zentralen, für die RA verwendeten Basistherapeutika aufgrund der Wirkungslosigkeit auch keine Anwendung finden, bzw. deshalb auch nicht für die OA zugelassen sind. Im Falle einer entzündlichen Aktivierung kann bei der OA eine Behandlung mittels Paracetamol, NSAR sowie intraartikuläre Glukokortikoid-Injektionen erfolgen [1]. Sowohl unter den RA- als auch unter den OA-Geweben fanden sich Proben, welche eindeutige Zeichen der aktiven Entzündung, wie z.B. Lymphozyten-Infiltrate, aufwiesen. Unterschiede zwischen beiden Gewebegruppen konnten somit primär bezüglich der unterschiedlichen Ursache der Entzündung beurteilt werden.

Alle der in die Ergebnisse eingeschlossenen Gewebeproben für OA und RA entstammen Kniegelenken, sodass Aussagen auf die Prozesse der Erkrankungen im Knie beschränkt sind. Damit wurde die Variabilität, die durch den Vergleich unterschiedlicher Gelenke entsteht, vermieden. Zwischen den Geweben bestanden Variationen bezüglich ihrer Größe und dem Vorhandensein auszuwertender Strukturen. Fehlten Strukturen, wurden diese Gewebe in der Beurteilung der entsprechenden Kategorie nicht berücksichtigt.

## **5.2 Etablierung der Tetraspanin-Immunhistochemie**

Fixierung, Einbetten sowie Schneiden der Gewebeproben erfolgte nach etablierten Methoden. Auch die Etablierung von IHC und IF entsprach in den Grundsritten bereits etablierten Protokollen. Weiterhin wurden sowohl unterschiedliche Proben eines Gewebetyps sowie unterschiedliche Arten von Gewebe getestet, wodurch die Fehlerursache im individuellen Gewebe oder der Gewebeart ausgeschlossen werden sollte. Eine Kompatibilität der Antikörper, die Inkubationszeit mit dem Primärantikörper sowie die Möglichkeit eines fehlenden Antigens wurden systematisch überprüft und ausgeschlossen. Somit konnten drei der vier Tetraspanine immunhistochemisch bzw. mittels Immunfluoreszenz mit den verfügbaren Antikörpern nachgewiesen und verglichen werden.

Fehlerquellen, welche die immunhistochemische Etablierung erschwerten und für eine IHC für CD9 im Rahmen dieser Arbeit keine Optimierung zuließen, können sich bei den verschiedenen Schritten der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz ergeben. Es zeigte sich in der Etablierung der IHCs für die verschiedenen Tetraspanine, insbesondere für CD9, die Problematik, dass zunächst kein Signal des Tetraspanin-AKS erkennbar war und/oder sich starke Signale in der Isotypkontrolle beobachten ließen. Ursache für eine fehlende oder nur schwache Färbung kann hierbei ein zu geringes Vorkommen des Antigens sein. Dem möglicherweise geringen Vorkommen des

Antigens wurde durch eine Signalverstärkung entgegengewirkt. Weiterhin wurde anhand der Herstellerangaben zu den Antikörpern die Eignung für die gewählten Verfahren geprüft. Als weitere Fehlerursache könnte der Fixierungsprozess das Antigen eventuell maskiert haben, wodurch eine Demaskierung notwendig würde bzw. eine andere Fixierungsmethode herangezogen werden müsste. Im Rahmen der durchgeführten IHC wurden mit Formalin fixierte Paraffinschnitte sowie mit Aceton fixierte Gefrierschnitte getestet. Beide Kombinationen (Formalin/ Paraffinschnitt und Azeton/ Gefrierschnitt) lieferten keine guten Ergebnisse für den Nachweis von CD9.

Auch eine zunächst zu starke Hintergrundfärbung bei der IHC-Etablierung zu CD9 kann durch unterschiedliche Aspekte begründet sein. Um diese zu prüfen und auszuschließen, wurden bei der Etablierung die Konzentration des Primär-AKs sowie die Art und Dauer des Blockens variiert und eine Inkubationstemperatur von 4 °C, verschiedene Inkubationslängen sowie ein Blockschritt zur Inaktivierung endogener Peroxidasen getestet. Dennoch konnten für CD9 im Gegensatz zu den anderen Tetraspaninen keine konstanten Ergebnisse in der IHC und IF erzielt werden, sodass die Etablierung für CD9 im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurde. Es könnte lohnenswert sein, in Zukunft weitere Protokollvarianten sowie weitere CD9-Antikörper zu testen. CD9 erscheint durch seine Eigenschaften wie beispielsweise die Fähigkeit, Entzündungsreaktionen auf Makrophagen zu modifizieren [52, 54] oder der vorwiegend supprimierende Einfluss bei der Tumorausbreitung [41, 52, 56] für weitere Forschungen im Bezug zur RA interessant. Interaktionen des CD9 sind zudem zu den in dieser Arbeit untersuchten Tetraspaninen CD81 und CD151 bekannt [35, 44, 52].

### **5.3 Tetraspanin-Immunfluoreszenz**

Der Einfluss einer möglichen Variabilität durch verschiedene Färbungsdurchgänge auf das Ergebnis der IF-Färbungen bei verschiedenen Gewebeproben wurde vermieden, indem die zu vergleichenden 15 OA- und RA-Gewebe jeweils in einem Durchgang mit dem etablierten Protokoll gefärbt wurden. Anschließend wurden die Schnitte mittels gleicher Einstellungen am Mikroskop fotografiert und unter gleichen Umgebungsbedingungen und Anzeigeprogramm am Computer ausgewertet. Eine Auswertung der IF-Färbungen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht computerbasiert, sondern durch subjektive Einschätzung. Um dennoch ein hohes Maß an Objektivität und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden für sämtliche Auswertungen semiquantitative Score-Varianten entwickelt und durch verschiedene Anwender getestet. Für die Auswahl der vergrößerten Ausschnitte zur Auswertung der speziellen

Kategorien wurde jeweils ein repräsentativer Ausschnitt des Gewebes identifiziert. Aufgrund der gewählten Methoden kann ein subjektiver Einfluss bei Betrachtung der vorgestellten Ergebnisse nicht vollständig ausgeschlossen werden. Insgesamt konnten die Tetraspanine CD63, CD81 und CD151 mittels Immunfluoreszenzfärbung etabliert und ausgewertet werden. Bei der Beurteilung der Färbungen lag der Fokus zunächst auf dem globalen Tetraspanin-Vorkommen in den Gewebearealen im Vergleich zwischen RA und OA, ohne auf die Signalintensität einzugehen. Die Intensität der Signale, die sich teilweise zwischen RA und OA signifikant unterschied, wird in Kapitel 5.5 separat diskutiert.

### **5.3.1 Verteilungsmuster des Tetraspanins CD63 im RA- und OA-Synovium**

Die für CD63 in anderen Studien festgestellte ubiquitäre Verteilung [34, 60, 61] konnte in dieser Studie bestätigt werden. Nahezu alle Zellen, die anhand der vorhandenen Kernfärbung mittels DAPI identifiziert werden konnten, wiesen ein Signal für CD63 auf. Ein ausgeprägter Unterschied im Verteilungsmuster zwischen OA- und RA-Gewebe ließ sich nicht feststellen. Ein Unterschied bezüglich CD63 zeigte sich bei Endothelzellen mit einem höheren Score-Wert bei OA im Vergleich zu RA, der jedoch nicht signifikant war. Für beide Gewebe lag der Mittelwert dennoch im Bereich einer mittelstarken bis starken Färbung und stellte somit keinen deutlichen Unterschied dar. Fehlende Unterschiede zwischen OA und RA könnten sich einerseits darauf zurückführen lassen, dass auch in OA-Gewebe Entzündungsprozesse stattfinden und sich die Gewebe möglicherweise bezüglich der vorliegenden Entzündungsreaktion ähneln. Auch bei Entzündungsprozessen im Rahmen der OA kommt es zur Einwanderung von Entzündungszellen. Eine Beteiligung durch CD63 kann hierbei ebenso eine Rolle spielen. Die ausgeprägte Expression von CD63 in fast allen Zellen kann kleine Differenzen im Verteilungsmuster überdecken. Zusätzlich sei erwähnt, dass Unterschiede in der Farbintensität zwischen den Bereichen feststellbar waren (s. Kapitel 3.10.1.3), die jedoch in einem separaten Score zur Quantifizierung der Farbintensität bei Zellen des *sublining*s überprüft wurden (s. Kapitel 3.10.1.5) und nachfolgend diskutiert werden.

Weiterhin auffallend war ein besonderes Färbemuster im Bereich der Kerne einiger Zellen in Form von isolierten Signalen des CD63-AKs. Eine dreidimensionale Beurteilung der Signal-Lokalisation war nicht möglich, sodass unklar bleibt, ob es sich hierbei um eine intra-, peri- oder extranukleäre Ansammlung von CD63 handelt. Eine Expression von CD63 sowohl auf Zelloberflächen als auch in Membranen von Endosomen [34, 59] und Exosomen [60, 61] konnte bereits in anderen Geweben

nachgewiesen werden. Auch in sekretorischen Granula von Eosinophilen, Neutrophilen und Basophilen, wurde CD63 gefunden und stellt einen Bestandteil der späten endosomalen und lysosomalen Membranen dar [59, 112]. Bei Eosinophilen konnte bereits gezeigt werden, dass CD63 in hohem Maße mit sekretorischen Ereignissen assoziiert und in Granula konzentriert ist, die aktiven Sekretionsvorgängen unterliegen [112]. Vesikel, zu denen auch Endo- und Exosomen gehören, werden durch eine Membran begrenzt, die mit der Zellmembran fusionieren kann. So können auch Oberflächenproteine, wie die Tetraspanine, in intrazellulären Membranen zu finden sein. Die Größe von Vesikeln ist variabel, kann dabei sogar in einem Bereich von einem Mikrometer liegen [5, 113]. Möglicherweise handelt es sich bei der in dieser Arbeit festgestellten punktuellen Färbung um CD63, welches in sekretorischen Vesikeln lokalisiert ist. Eine starke Ausbildung dieses Färbemusters zeigte sich in dieser Arbeit gerade bei Zellen in entzündlichen Infiltraten. Die Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer Faktoren spielt in der Pathogenese der RA eine entscheidende Rolle [4]. Dabei bilden sowohl RASF als auch einwandernde Entzündungszellen wie Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen Zytokine und Chemokine [1, 4, 9, 11]. Eine Sekretion von Proteinen in den extrazellulären Raum erfolgt üblicherweise über eine Exozytose von sekretorischen Vesikeln [113]. Infiltrate mit einwandernden Entzündungszellen könnten somit durch eine vermehrte Sekretion proentzündlicher Faktoren und somit auch mit einer erhöhten Anzahl von mit CD63-assoziierten sekretorischen Vesikeln gekennzeichnet sein. CD63 könnte dabei Bestandteil der Membranen dieser Vesikel sein und koordinierende Eigenschaften besitzen. Dass das bei dieser Arbeit beobachtete Färbemuster in Form von isolierten Signalen des CD63-AKs nur in einzelnen Zellen beobachtet wurde, lässt sich eventuell durch eine mittels entzündlicher Stimuli nur vereinzelt induzierte Aktivierung und Sekretion von entzündlich aktivierten und spezifischen Zellen erklären. Im Rahmen einer Studie wurden bereits im Vergleich von durch entzündliche Stimuli aktivierte sowie unstimulierte eosinophile Granulozyten unterschiedliche Expressionsmuster von CD63 beobachtet. Dabei zeigten unstimulierte Zellen eine schwache oder keine Fluoreszenz, während durch einen bestimmten entzündlichen Stimulus aktivierte Eosinophile eine punktförmige, helle Markierung mit fokalen Immunfluoreszenzflecken aufwiesen, welche einer Sekretion durch stückweise Degranulation ähneln [112]. Entsprechend wären zelluläre Analysen unter entzündlicher Stimulierung von Interesse, die aufzeigen könnten, ob das spezifische Expressionsmuster in vitro in kultivierten Zellen induziert werden kann. Andererseits könnte es sich auch bei den in dieser Arbeit beobachteten isolierten Signalen des CD63-AKs um neu synthetisiertes CD63 handeln, welches im

endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat modifiziert oder bereits über Vesikel zur Zellmembran befördert wird, wo es anschließend als Membranbestandteil inkorporiert wird. Eine vermehrte Bildung und Inkorporation von CD63 in die Zellmembran könnte durch einen Stimulus induziert sein. In einer Studie zu T-Zellen wurde eine minimale Expression von CD63 auf ruhenden T-Zellen beobachtet. Bei Stimulation der T-Zellen wurde jedoch eine vermehrte Expression von CD63 an der Oberfläche nachgewiesen [114]. Es wurde vermutet, dass CD63 dort durch Vermittlung einer Kostimulation der T-Zelle an einer ausgeprägten Proliferationsinduktion, einer starken IL-2-Produktion und einer gesteigerten T-Zell-Reaktionsfähigkeit auf Restimulation beteiligt ist. CD63 würde damit ein aktivierungsinduziertes Verstärkungselement darstellen, dessen Triggern eine nachhaltige und effiziente T-Zell-Aktivierung und -Expansion fördert [114]. Ein solcher Prozess könnte auch im Rahmen des Entzündungsgeschehens der RA von Bedeutung sein und könnte ebenfalls in kultivierten Zellen nach proentzündlicher Aktivierung geprüft werden.

Eine mögliche Lokalisation auf Endosomen, wie sie bereits beobachtet wurde [34, 59], ergäbe sich durch Einstülpung und Abschnüren von Teilen der Zellmembran, in welchen sich auch das Transmembranprotein CD63 befindet. Nachgewiesen wurde CD63 als Bestandteil später endosomaler und lysosomaler Membranen [59]. Aufgrund der Größe und Verteilung der in dieser Arbeit beobachteten isolierten Signale des CD63-AKs wäre ein Hervorrufen durch Lokalisation von CD63 in endosomalen bzw. lysosomalen Membranen denkbar. Eine Lokalisation von CD63 auf Exosomen wurde ebenfalls in Studien nachgewiesen [60, 61]. Exosomen sind nanogroße (30–100 nm) extrazelluläre Partikel mit Eigenschaften zur Regulierung biologischer Prozesse und zellulärer Signalübertragung durch die Übertragung von Proteinen und genetischem Material [115]. Sie könnten ebenfalls in der Pathogenese der RA von Bedeutung sein. Das in dieser Arbeit beobachtete Färbemuster in Form isolierter Signale von CD63 erscheint jedoch für Exosomen unwahrscheinlich, da sich das punktuelle Färbemuster nur im Bereich der Kerne lokalisiert zeigte, während es sich bei Exosomen um extrazelluläre Vesikel handelt [115].

In verschiedenen Studien wurde eine Beteiligung des CD63 bei Zelladhäsion, Motilität, Proliferation, Differenzierung und dem Überleben von Zellen nachgewiesen [60, 62, 63]. Diese zellulären Vorgänge spielen auch bei der Infiltration von Entzündungszellen in entzündetes Gewebe eine Rolle [19]. Eine in dieser Arbeit beobachtete vermehrte Expression von CD63 in Zellen von Infiltraten könnte dabei auch auf eine Beteiligung dieser Prozesse hinweisen. Die damit verbundene, vermehrte Expression von CD63 in den aktivierten Entzündungszellen könnte mit einer verstärkten Zelladhäsion und

Motilität verbunden sein. Auch eine starke Färbung in Zellen der Gefäßwände erscheint durch deren Aufgabe der Vermittlung der Diapedese von Entzündungszellen vom Gefäßlumen durch die Gefäßwand und der damit verbundenen Prozesse der Zelladhäsion erklärbar.

Im Erkrankungsverlauf der RA verdickt sich das *lining layer*. Es kommt zur Zunahme von Synoviozyten, wobei sowohl die synovialen Makrophagen als auch die synovialen Fibroblasten betroffen sind [9]. Da sich bereits in anderen Studien eine Beteiligung von CD63 bei der Proliferation von Zellen zeigte [63], könnte die in dieser Arbeit beobachtete starke Färbung im *lining layer* mit einer Beteiligung von CD63 bei der Zunahme der Synoviozyten und der Verdickung des *lining layers* im Verlauf der RA zusammenhängen. Ebenso spielen synoviale Fibroblasten eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der RA, indem sie Zytokine, Chemokine sowie Proteasen sezernieren, welche die Entzündung aufrechterhalten und zur Knorpelzerstörung beitragen [9, 11]. Auch in diesem Prozess könnte CD63, ähnlich wie in der bereits für einwandernde Entzündungszellen in Infiltraten erörterten Vermutung, in der Membran von sekretorischen Vesikeln lokalisiert sein und dort koordinierende Aufgaben übernehmen. So ließen sich die in dieser Arbeit beobachteten isolierten Signale des CD63-AKs auch in einzelnen Zellen im *lining layer* und *sublining* beobachten. Sowohl *lining layer* als auch *sublining* sind durch ein Vorkommen von aktivierten Fibroblasten gekennzeichnet [5].

Die vereinzelt beobachtete Aussparung der CD63-Färbung innerhalb der Gefäßwandschichten (vgl. Abb. 7B) konnte in 24 der 29 eingeschlossenen Geweben in mindestens einem Gefäß nachgewiesen werden. Betrachtet man diese Aussparung genauer, erkennt man einen ringförmigen Bereich innerhalb der Gefäßwandschichten, welcher in der IF-Färbung weder Signal des CD63-AKs noch Zellkerne aufwies. Bei Vergleichen dieses Bereiches mit der entsprechenden H/E-Färbung entspricht dieser der Media oder einer verdickten Membrana elastica interna, da diese nach außen der Endothelzellschicht anliegen. Gegen die Media spricht, dass sich in der beschriebenen Aussparung der CD63-Färbung keine Zellkerne nachweisen lassen. Dieses Merkmal wäre vereinbar mit der Membrana elastica interna, bei der es sich um eine kräftige Lamelle handelt, die aus elastischem, extrazellulärem Material besteht [5]. Eine Lokalisation des Transmembranproteins CD63 ist hier nicht zu erwarten, sodass die in dieser Arbeit beobachtete Aussparung der CD63-Färbung für diesen Bereich passend erscheint. Eine nur vereinzelt Ausprägung dieser Aussparung ließe sich damit erklären, dass eine Membrana elastica interna bei kleineren Arterien und generell bei Venen weniger stark bis nicht ausgeprägt ist [5].

Die Färbung in entzündlichen Infiltraten und das spezielle Färbemuster in Form von

isolierten Signalen von CD63, welches vereinzelt im Kernbereich von Zellen in *lining layer*, Gefäßen, *sublining* und Infiltraten beobachtet wurde, könnte mit einer vermehrten Expression von CD63 durch aktivierte Zellen zusammenhängen. Ein möglicherweise bestehender erkrankungsfördernder oder -hemmender Einfluss des Tetraspanins CD63, wie er für einige Tumorerkrankungen nachgewiesen werden konnte [34, 41, 60, 63, 65–70], lässt sich im Rahmen der hier durchgeführten histologischen Analyse jedoch nicht erkennen. Diesbezüglich könnte im Rahmen weiterer Untersuchungen auf zellulärer Ebene mittels CD63-Überexpression bzw. -Knockdown beispielsweise der Einfluss des Tetraspanins auf Motilität, Migration, Adhäsion und Proliferation von RA-synovialen Fibroblasten geprüft werden.

### **5.3.2 Verteilungsmuster des Tetraspanins CD81 im RA- und OA-Synovium**

Ähnlich zum CD63 ließ sich bei fast allen Geweben eine starke Färbung im gesamten Gewebe feststellen. Eine Expression in einer Vielzahl von Zellen ist für CD81 bekannt [51]. Es konnte zum Beispiel in Zellen des hämatopoetischen Systems wie B-Zellen, T-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen, aber auch anderen Zellen wie Trophoblastenzellen nachgewiesen werden [75, 76]. Auch im Rahmen dieser Arbeit fiel auf, dass nahezu alle Zellen, die anhand der Kernfärbung identifiziert werden konnten, ein entsprechendes Signal für CD81 aufwiesen. Im Vergleich zum CD63 und CD151 besonders auffallend war die überwiegende Aussparung des CD81-Signals im Bereich der Zellkerne. Besonders in der Doppel-IF mit CD151 (s. Kapitel 5.4) ließ sich die Aussparung des CD81-Signals gut erkennen. Gleichmäßige und flächige Signale des Antikörpers projizierten sich im Bereich des Zytoplasmas. Da eine solche Lokalisation auch einem Antikörpersignal von der Zellmembran entsprechen könnte und es sich bei dem Tetraspanin um ein Transmembranprotein handelt, ist CD81 möglicherweise auch Bestandteil der Zellmembran und im Vergleich zu CD63 weniger lokalisiert in Zellorganellen zu finden. Eine genauere Identifizierung der signalgebenden Zellstruktur ist aufgrund der zweidimensionalen Betrachtung der Gewebeschnitte nicht möglich und könnte mit einer dreidimensionalen Methode wie der konfokalen Mikroskopie gelingen. Weiterhin ließen sich bei CD81 stärkere Signalintensitäten von *lining layer*, Gefäßwänden und verschiedener Zellen im *sublining* beobachten. Da eine computerbasierte Auswertung der Signalintensität im Rahmen dieser Arbeit nicht realisierbar war, wurde die Farbtintensität exemplarisch bei Zellen des *sublinings* mittels eines definierten Scores überprüft (s. Kapitel 3.10.1.5).

Für CD81 zeigte sich bereits in verschiedenen Studien unter anderem eine Rolle bei Adhäsion, Migration, Proliferation, Rezeptorclustering und der Signalübertragung in Zellen [75, 78]. Dies lässt sich mit den bereits erwähnten Funktionen des CD63 vergleichen. So scheint auch für CD81 ein Zusammenhang zwischen der starken Expression in Zellen von *lining layer*, Gefäßen und *sublining* (insbesondere bei Infiltraten) und einer bereits beschriebenen vermehrten Migration und Proliferation sowie Vorgängen der Zelladhäsion [75, 78], denkbar. Unterschiede zwischen OA- und RA-Gewebe konnten in diesen Färbungen bezüglich der Verteilungsmuster jedoch nicht beobachtet werden.

Die stärkere Färbung im Endothel der Gefäße im Vergleich zu Media und Adventitia war bei drei von 15 RA-Gewebe sowie einem OA-Gewebe und insgesamt nur in einzelnen Gefäßen zu beobachten. Aufgrund dieses geringen Vorkommens scheint dies kein typisches synoviales Färbemuster darzustellen und kann mit einer möglichen lokalen Gefäßaktivierung oder einer remissionsbedingten Reduktion der Entzündungsvorgänge in den betroffenen Geweben zusammenhängen, was jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde.

Ein möglicherweise bestehender vorwiegend erkrankungsfördernder Einfluss des Tetraspanins CD81, wie er für einige Tumorerkrankungen gezeigt werden konnte [41, 43, 74, 77, 79], lässt sich im Vergleich zur OA nicht feststellen. Dieser Vergleich könnte über den Einbezug von gesundem Synovialgewebe sowie funktionellen zellulären Tests geklärt werden, die jedoch nicht im Rahmen der Aufgabenstellung dieser Arbeit lagen.

### **5.3.3 Verteilungsmuster des Tetraspanins CD151 im RA- und OA-Synovium**

Wie bereits in verschiedenen Studien beschrieben, zeigte sich CD151 weit verbreitet in mehreren Zelltypen [73]. Eine Färbung ließ sich auch in dieser Arbeit in nahezu allen Geweben für Zellen aller Bereiche des RA- und OA-Synoviums beobachten. Im Vergleich zu anderen bewerteten Gewebearealen war CD151 durchschnittlich etwas weniger exprimiert in Zellen des *lining layers* im OA- und RA-Gewebe sowie in Endothelzellen von RA-Gewebe. Der bei Zellen des *lining layer* durchschnittlich niedrigere Score-Wert beruht auf 2/15 OA-Gewebe mit einem Score von eins und 3/15 RA-Gewebe mit einem Score von null bis eins. Somit basiert der Unterschied auf wenigen Geweben. Insgesamt konnten keine weiteren Unterschiede zwischen OA- und RA-Gewebe bezüglich der allgemeinen Verteilungsmuster für CD151 (ohne Berücksichtigung der Signalintensität) beobachtet werden. Da auch für CD151 unter anderem eine Beteiligung bei der Aufrechterhaltung einer normalen zellulären Integrität, der Kommunikation zwischen Zellen [73, 85] sowie bei der Zellmotilität [84] festgestellt

werden konnte, wäre auch bei CD151, wie bereits bei den Tetraspaninen CD63 und CD81 vermutet, ein Zusammenhang zwischen der Expression in Zellen von *lining layer*, Gefäßen und *sublining* mit einer verstärkten zellulären Aktivierung in diesen Gewebearealen zu vermuten, die sich in einer erhöhten Migration sowie veränderten Vorgängen der Zelladhäsion und –kommunikation, ggf. insbesondere im Bereich des *sublinings*, darstellen könnten. Die für CD151 ebenfalls gezeigte Rolle bei der Angiogenese [84] und Expression als Oberflächenprotein in Endothelzellen [73] könnte auch zur Entzündung bei der RA oder der OA beitragen. Gerade für die RA ist eine Gefäßneubildung [12] und eine erhöhte Gefäßdichte [13] bekannt. Der zudem beobachtete Einfluss auf die Wundheilung [83] könnte, bezogen auf die vorliegende Entzündung bei beiden Erkrankungen, ebenfalls von Bedeutung sein. Die funktionelle Bedeutung des CD151 muss jedoch gezielt in zellulären Assays geklärt werden, die nicht im Rahmen der Aufgabenstellung dieser Arbeit lagen.

Auffallend für CD151 war ein spezielles Färbemuster in Form von isolierten Signalen des CD151-AKs im Bereich der Kerne von Zellen, welches dem von CD63 ähnelte. Eine solche Kernfärbung fand sich bei CD151 in nahezu allen Zellen im *lining layer*, in Gefäßen, im *sublining* und Infiltraten aller Gewebeproben. Unterschiede zwischen OA- und RA-Geweben ließen sich dabei nicht feststellen. Vorangegangene Studien haben eine intrazelluläre Expression von CD151 in zytoplasmatischen Vesikeln und perinukleären Regionen [75] sowie die Beteiligung bei der Regulation der Membranfusion [77] nachgewiesen. Wie im Fall von CD63 lässt sich daher die Vermutung aufstellen, dass es sich bei dem Färbemuster um Vesikel mit erhöhter CD151-Dichte handeln könnte.

Die starke Färbung von CD151 der Zellausläufer von Zellen des *sublinings* betraf ebenso nahezu alle Gewebe. Auffallend war hierbei die Form der Ausläufer, welche stark an die Form von Fibroblasten erinnern lässt. Eine eindeutige Identifikation als Fibroblasten müsste jedoch z.B. durch Doppelfärbungen erst folgen, war jedoch nicht Teil der Aufgabenstellung dieser Arbeit. Die verstärkte Expression in fibroblastären Zellausläufern könnte jedoch auf eine erhöhte Motilität der Zellen im Bereich des *sublinings* hinweisen.

Weniger häufig war eine verhältnismäßig starke Färbung des Endothels im Vergleich zu Media und Adventitia zu beobachten. Eine solche Färbung betraf etwa die Hälfte der Gefäße im Gewebe (Score 2), im RA-Gewebe mit etwas geringerer Tendenz. Fünf der 15 OA- und sechs der 14 eingeschlossenen RA-Gewebe wiesen für das Merkmal einer verhältnismäßig starken Färbung des Endothels im Vergleich zu Media und Adventitia auf (Score 0-1), darunter die bereits oben erwähnten Gewebe mit generell schwächerer

Färbung. Die Kategorie der verhältnismäßig starken Färbung des Endothels im Vergleich zu Media und Adventitia erscheint vor dem Hintergrund der bereits in anderen Studien nachgewiesenen Beteiligung des Tetraspanins CD151 bei der Angiogenese [84] und Expression als Oberflächenprotein in Endothelzellen [73] von Bedeutung.

Ein möglicherweise bestehender fördernder Einfluss des Tetraspanins CD151 auf die Migration von Zellen, wie er für einige Tumorerkrankungen gezeigt werden konnte [41, 73, 81, 84–86, 89–95], lässt sich im Rahmen der hier durchgeführten histologischen Analyse zwar nicht nachweisen, können jedoch auf entsprechende Veränderungen hinweisen. Die Färbung in entzündlichen Infiltraten und insbesondere die isolierten Signale des CD151-AKs im Bereich der Kerne von Zellen in *lining layer*, Gefäßen, *sublining* und Infiltraten weisen auf eine vermehrte Expression von CD151 durch aktivierte Zellen hin. Der dabei beobachtete Zusammenhang zwischen einer hochregulierten CD151-Expression und der Resistenz gegen eine medikamentöse Tumorthherapie [96], könnte auch im Hinblick eines eventuellen Einflusses auf eine Resistenz der medikamentösen Therapie bei der RA interessant sein. Ein weiteres Resultat aus vorherigen Forschungen zur Arthrose zeigte eine Überexpression von CD151 im betroffenen Knorpel und die Vermutung eines Einflusses beim Prozess der Knorpelzerstörung [98]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zwar kein Knorpel untersucht, aber da der Prozess der Knorpelzerstörung auch bei der RA von großer Bedeutung ist, erscheint eine weitere Untersuchung von CD151 in Gewebe mit Knorpel interessant.

Insgesamt zeigten sich die Verteilungsmuster der Tetraspanine homogen bei RA- und OA-Geweben. Jedoch gab es Gewebe, die sich im Verteilungsmuster unterschieden. So zeigte sich bei einem RA-Gewebe ein Abweichen im Verteilungsmuster in Zellen des *lining layer* und in Endothelzellen für CD151 und bei Endothelzellen für CD63 im Vergleich zu den anderen Geweben. Dieses Gewebe zeigte generell bei allen Färbungen zu den drei Tetraspaninen ein weniger ausgeprägtes Verteilungsmuster. Die zu diesem Gewebe vorhandenen klinischen Daten ergaben keine erhöhten Entzündungswerte oder Auffälligkeiten im Rahmen des klinischen Erscheinungsbildes, allerdings wurde eine Einnahme von drei entzündungshemmenden Medikamenten (Glukokortikoid, Methotrexat und Abatacept) angegeben. Auch im Gewebe ließen sich keine Entzündungszeichen wie beispielsweise ein Infiltrat beobachten. Ein weiteres RA-Gewebe zeigte in Zellen des *lining layer* und Endothelzellen bei den Färbungen aller Tetraspanine ein schwach ausgeprägtes Verteilungsmuster. Die klinischen Daten wiesen auf einen leichten Entzündungsgrad und die Einnahme zwei entzündungshemmender Medikamente (Methotrexat und Meloxicam) hin. Auch dieses

Gewebe wies kein Infiltrat als aktives Entzündungszeichen auf. Beide Gewebe zeigten somit nur leichte Entzündungswerte in den klinischen Daten sowie keine Entzündungszeichen in den Geweben. Hierbei könnten sich die beiden Patienten in der Phase einer Remission mit Rückgang des Entzündungsgeschehens befinden und dies könnte mit einer geringen Tetraspanin-Expression einhergehen. Allerdings kann eine geringere Anfärbbarkeit im Prozess der Gewebeerarbeitung oder Schnittherstellung bei diesen Geweben nicht vollständig ausgeschlossen werden. Hinweise auf fibrotische Veränderungen im *sublining* gab es für die erwähnten Gewebe nicht. Da für das *lining layer* in OA- und RA- sowie Endothelzellen in RA-Geweben durchschnittlich eine mittelstarke Färbung mit Tendenz zur starken Färbung vorlag, konnte der Unterschied im Verteilungsmuster anhand der klinischen Daten nicht geklärt werden.

#### **5.4 Verteilungsmuster von CD81 und CD151 in der Doppel-Immunfluoreszenz**

Eine Doppel-IF wurde für die beiden Tetraspanine CD81 und CD151 erfolgreich etabliert und jeweils sechs OA- und RA-Gewebe gefärbt und ausgewertet. Es zeigten sich dabei keine Unterschiede zwischen OA und RA bei den Verteilungsmustern beider Tetraspanine. Kleinere Unterschiede sollten auf der Basis der limitierten Probenzahl für OA und RA vorsichtig interpretiert und kritisch bewertet werden. Mittels der Doppel-IF konnte jedoch die Lokalisation der beiden Tetraspanine zueinander gut dargestellt und erfasst werden. Im zytoplasmatischen Bereich von Zellen in Gefäßen und im *sublining* fand sich vorwiegend eine Expression von CD81. Dagegen zeigte sich im Bereich der Kerne von Zellen in *lining layer*, Gefäßen sowie bei der Hälfte der Gewebe auch in Zellkernbereich des *sublinings* ein Signal für CD151. Eine Expression beider Tetraspanine ließ sich dagegen im zytoplasmatischen Bereich von Zellen im *lining layer*, in den Zellausläufern von Zellen im *sublining* und bei der Hälfte der Gewebe in den Zellkernbereichen des *sublinings* erkennen. Hierbei muss angemerkt werden, dass die Lokalisation an der Zellstruktur orientiert stattfand. Der als Zytoplasma benannte Bereich umgibt den Zellkern. Ob es sich hierbei um ein Signal von der Zellmembran handelt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, könnte aber über konfokale Mikroskopie genauer beleuchtet werden. Die in der Doppel-IF beobachtete Signalverteilung der beiden Tetraspanin-AKs gegen CD81 und CD151 würde die zuvor geäußerte Vermutung, dass CD81 vorwiegend in der Zellmembran und CD151 auch in Membranen von intrazellulären Organellen wie beispielsweise sekretorischen Vesikeln exprimiert wird, unterstützen. Bei dem in der Doppel-IF beobachteten orangenen bzw.

gelb-grünen Signal sowohl im zytoplasmatischen Bereich von Zellen im *lining layer* als auch in den Zellausläufern von Zellen des *sublinings* ist auf ein Überlagerungssignal aus beiden Antikörpern zurückzuführen, sodass hier eine Ko-Expression der beiden Tetraspanine CD81 und CD151 in der Zellmembran oder im Zytoplasma vermutet werden kann. Eine Lokalisation in der Zellmembran erscheint wahrscheinlicher, da es sich bei Tetraspaninen um Transmembranproteine handelt und die Signale in dem beschriebenen Bereich gleichmäßig und flächig erschienen. Auch hier wäre eine konfokale Mikroskopie zur genaueren Lokalisation des Signalursprungs interessant. Besonders auffallend zeigte sich auch bei der Doppel-IF das spezielle Färbemuster des CD151-AKs in Form von isolierten Signalen. Diese zeigten sich im Bereich der Zellkerne. Eine Überlagerung des CD81-AKs durch ähnliche isolierte Signale konnte nicht beobachtet werden, sodass bei dieser Lokalisation vermutlich eine alleinige Expression des Tetraspanins CD151 vorliegt. Eine weitere Identifikation dieser Struktur beispielsweise durch eine konfokale Mikroskopie könnte weiteren Aufschluss über die Aufgabe dieser Zellstruktur und damit auch über eine mögliche Bedeutung des Tetraspanins CD151 in zellulären Vorgängen bzw. in der Pathogenese der RA geben.

Auch in der Doppel-IF wurde zur Analyse ein semiquantitativer Score zur Auswertung der Expression von CD81 und CD151 entwickelt. Subjektive Einflüsse bei der Bewertung können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Orange oder gelbe bis hellgrüne Signale wurden in diesem Score als überschneidende Signale der beiden Tetraspanine definiert. Die Signale können sich einerseits durch gemeinsame Lokalisation überlagern oder andererseits getrennt in zwei Ebenen vorliegen. Die finale Ko-Lokalisation kann erst durch konfokale Mikroskopie zur Auflösung der dreidimensionalen Struktur im Gewebe ermittelt werden. Dabei könnte auch die für die beiden Tetraspanine CD81 und CD151 bekannte Fähigkeit, Komplexe in sogenannten TEMs (*tetraspanin-enriched microdomains*) zu bilden und Interaktionen miteinander einzugehen [43, 73, 75, 78, 79] genauer untersucht werden, da diese Interaktionen eine Auswirkung auf zelluläre Funktionen wie Zellbewegung und Adhäsion haben [28, 33].

Eine Doppel-IF für die beiden Tetraspanine CD63 und CD151 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht etabliert. Die Darstellung der Lokalisation beider Tetraspanine im direkten Vergleich, wäre aber insbesondere durch das Auftreten von isolierten Signalen, welche sowohl für den CD63- als auch für den CD151-AK im Bereich von Zellkernen beobachtet werden konnten, von großem Interesse. Das Vorkommen einer Ko-Lokalisation der Tetraspanine CD63 und CD151 in TEMs ist bereits bekannt [73]. Somit bietet diese

Arbeit die Basis für weitergehende Untersuchungen zur Anreicherung von TEM in der Zellmembran pathophysiologisch relevanter Zellen bei der RA.

### **5.5 Vergleich der zellulären Signalintensität der Tetraspanin-Färbemuster im RA- und OA-Synovium**

Bei der Auswertung der Farbintensität von Zellen im *sublining* wiesen bei allen drei Tetraspaninen CD63, CD81 und CD151 nahezu alle Zellen ein Signal auf. Für das Tetraspanin CD63 zeigte sich bei der Auswertung der Farbintensität in der IF-Färbung ein höherer Anteil stark positiv gefärbter Zellen im *sublining* von RA-Gewebe als im *sublining* von OA-Gewebe. Auch der Unterschied zwischen stark und schwach positiven Zellen erwies sich in RA-Gewebe als statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ). Dies könnte auf eine erhöhte Expression des Tetraspanins CD63 im Rahmen der RA hinweisen. Zu den im *sublining* vorkommenden Zellen gehören Fibroblasten, Fettzellen, Makrophagen und Lymphozyten [5]. Hier könnte eine erhöhte Expression des Tetraspanins CD63 insbesondere bei Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten zu einer vermehrten Migrationsfähigkeit und damit zu einem krankheitsfördernden Effekt führen. Im Rahmen von Studien zu Tumorerkrankungen wurde ein solcher Einfluss bereits beobachtet [34, 41, 60, 63, 65–70]. Dies wird weiterhin durch die Beobachtung unterstützt, dass insbesondere längliche Zellen mit langen Ausläufern, welche in ihrem Aussehen Fibroblasten entsprechen, eine CD63-Expression zeigen.

Bei Betrachtung des Tetraspanins CD81 ergab sich im Vergleich zu RA-Gewebe ein höherer Anteil stark positiver Zellen im *sublining* von OA-Gewebe. In RA-Gewebe überwog der Anteil schwach positiver Zellen. Dabei wiesen OA- und RA-Gewebe signifikante Unterschiede zwischen stark und schwach positiven Zellen auf (OA  $p < 0,001$ ; RA  $p = 0,016$ ). Im Rahmen der Forschung zu Tumorerkrankungen konnte ein vorwiegend metastasierungsfördernder Einfluss beobachtet werden [41, 43, 74, 77, 79]. Durch eine reduzierte Expression von CD81 in Zellen des *sublinings* im RA-Gewebe könnte somit die Migrationsfähigkeit von Zellen gehemmt sein, wodurch eventuell entzündungs- und krankheitsfördernde Zellen den Bereich der Entzündung und Destruktion nicht verlassen könnten. Eine ähnliche Beobachtung konnte bereits im Kontext der RA für CD82 gemacht werden [29].

Für das Tetraspanin CD151 ergaben sich bei der Auswertung der Farbintensität in den Zellen des *sublinings* keine Unterschiede zwischen OA- und RA-Gewebe. Wurden OA- bzw. nur RA-Gewebe bezüglich zellulärer Farbintensität separat betrachtet, wiesen

sowohl OA-Gewebe als auch RA-Gewebe einen signifikanten Unterschied zwischen dem Anteil stark positiv gefärbter und dem Anteil schwach positiv gefärbter Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl auf ( $p < 0,001$  für jeweils OA sowie RA). Dabei ließen sowohl OA- als auch RA-Gewebe einen deutlich höheren Anteil stark positiver Zellen erkennen. Da OA und RA beide mit Entzündungsgeschehen einhergehen können, schließt eine sich zwischen den Erkrankungen nicht unterscheidende Expression von CD151 eine Beteiligung an Entzündungsvorgängen nicht aus. Jedoch würde eine solche Beteiligung sich als nicht spezifisch für die RA erweisen. Im Rahmen von Studien zu Tumorerkrankungen wurde ein migrationsfördernder Einfluss von CD151 bereits beobachtet [41, 73, 81, 84–86, 89–95]. So könnte eine starke Expression des Tetraspanins, wie sie sich in Zellen des *sublinings* zeigte, insbesondere bei Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten zu einer vermehrten Migrationsfähigkeit und damit zu einem krankheitsfördernden Effekt führen. Da die drei Tetraspanine jeweils auf 15 RA- und OA-Geweben derselben Patienten nachgewiesen wurden und Unterschiede in der Farbintensität für die jeweiligen Tetraspanine zwischen OA- und RA-Gewebe sowie der Anteile stark und schwach positiv gefärbter Zellen zu beobachten waren, impliziert dies, dass Tetraspanine unterschiedliche oder sogar entgegengesetzte Aufgaben besitzen könnten.

Die Auswertung der Farbintensität des Fluoreszenzsignals erfolgte anhand im Rahmen dieser Arbeit definierter semiquantitativer Scores. Die Definition der Einteilung in starke und schwache Intensitäten erfolgte hauptsächlich durch die Promovendin. Um den subjektiven Einfluss zu reduzieren, wurden verschiedene Maßnahmen ergriffen. Einerseits wurde der semiquantitative Score inklusive einer detaillierten Beschreibung des Vorgehens und der Umgebungsbedingungen zur Beurteilung der Farbintensität generiert, um die Reproduzierbarkeit zu erleichtern. Weiterhin wurde der Score durch zwei weitere Personen anhand der Beschreibung angewendet. Im Vergleich dieser drei unterschiedlichen und unabhängig beurteilten Ergebnisse, fielen zwar Unterschiede zwischen den drei Scorerern bei der Auswertung einzelner Gewebe sowie den arithmetischen Mittelwerten für alle OA- oder RA-Gewebe bezüglich der Anzahl an stark, schwach oder nicht positiven Zellen auf. Wurde jedoch der arithmetische Mittelwert für alle OA- oder RA-Gewebe bezüglich des Anteils dieser Zellen an der Gesamtzahl betrachtet, zeigte sich nur ein sehr geringer Unterschied zwischen den Scorerern (Standardabweichungen zwischen 2 % und 7 %). Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Scorer sind auf das individuelle Vorgehen beim Ein- und Ausschließen der für die Bewertung insgesamt beurteilten Zellen zurückzuführen. Die Definition,

welche Zellen des *lining layers* oder der Gefäße nicht eingeschlossen werden sollten, erwies sich zwar als schwierig und ließ Interpretationsspielraum zu, mit der Berechnung des Anteils stark oder schwach positiver Zellen an der Gesamtzellzahl konnte dieser Unterschied jedoch verringert werden. Eine Stichprobenanzahl von 15 Geweben für OA und RA trug weiterhin zur Reduktion individueller Unterschiede bei. Aufgrund des geringen Unterschieds zwischen den drei unabhängigen Scorerern für die Bewertung von stark oder schwach positiven Zellen in Bezug auf die Gesamtzellzahl wurde eine ausreichende Validität von Score und Vorgehen bei der Auswertung von CD63 angenommen. Es erfolgte anschließend eine weitere Auswertung für die Tetraspanine CD81 und CD151 durch die Promovendin selbst, die auch den Gewebeausschnitt zur Quantifizierung in 400-facher Vergrößerung ausgewählt hatte. Demnach handelt es sich bei den Ergebnissen zur Farbintensitätsauswertung um eine Tendenz, welche durch andere Verfahren validiert und daher kritisch bewertet werden müssen.

## 5.6 Korrelationen der Expression von Tetraspaninen

Die Ergebnisse zur histologischen Expression der verschiedenen Tetraspanine wurden mit klinischen Daten korreliert. Die durchgeführten Korrelationsanalysen sollten neben möglicherweise bestehenden Korrelationen zwischen den Tetraspaninen untereinander auch eventuelle Einflüsse verschiedener Krankheitsverläufe aufdecken. Aufgrund der Beschränkung des Wertespektrums des Scores zur Auswertung der IF-Färbungen auf vier Werte (Score 0 bis 3) könnten Korrelationen zufällig entstehen. Daher wurden Proben von je 15 verschiedenen RA- und OA-Proben analysiert. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass kleine Unterschiede mit dem Score nicht erfasst werden können.

Für die Expression des Tetraspanins CD63 ergab sich eine Korrelation zwischen der CD63-Expression in Endothelzellen mit der CD63-Expression durch Zellen des *sublinings*. Bei einem Korrelationskoeffizienten von  $r_s=0,46$  lag eine ungleichmäßige Verteilung mit Konzentration der meisten Werte auf einzelnen Punkten vor. Es lässt sich somit nur erkennen, dass, wenn viele Endothelzellen CD63 exprimieren, dies auch für die Zellen im *sublining* zutrifft. Würde CD63, wie bereits in Kapitel 5.3.1 vermutet, eine Rolle bei der Vermittlung der Infiltration von Entzündungszellen in entzündetes Gewebe spielen, könnte diese Korrelation einen Hinweis darauf geben, dass hier verstärkt Entzündungszellen durch die Gefäße und das angrenzende *sublining* geführt werden. Die Korrelation der CD63-Spezialkategorien Kernmuster LL vs. Kernmuster EZ (Abb. 26) zeigt, dass auch hier statistisch ein Zusammenhang besteht ( $r_s=0,62$ ). Wenn in vielen

Endothelzellen ein Kernmuster vorliegt, dann ist dies auch in vielen Zellen des *lining layers* ausgeprägt. Eine vergleichbare Korrelation fand sich für das Kernmuster LL vs. Kernmuster Media/Adventitia ( $r_s=0,65$ ). Ist in vielen Zellen der Media/Adventitia das Kernmuster erkennbar, ist es auch in Zellen des *lining layers* ausgeprägt. Dies könnte sich dadurch erklären, dass in diesen Gewebearealen CD63 exprimiert und in die Zellmembranen befördert wird, um dort z.B. zur Vermittlung der Migration von Entzündungszellen beizutragen.

Bei der Korrelation Kernmuster LL vs. Antiphlogistika (Abb. 26) ließ sich bei einem Signifikanzniveau von 0,01 und  $r_s=0,62$  ein moderater Zusammenhang zwischen den Kategorien ermitteln, ein linearer Zusammenhang war graphisch nicht erkennbar, da die Werte sich weit um die Regressionsgerade verteilten. Dies betraf auch die Korrelation zwischen Kernmuster EZ vs. Antiphlogistika (Abb. 26) sowie Kernmuster EZ vs. Alter des Patienten bei Entnahme (Abb. 26), bei denen ebenfalls eine breite Streuung der Werte beobachtet wurde. Die Korrelationskoeffizienten nach Spearman wiesen auf einen schwachen Zusammenhang der entsprechenden Kategorien hin ( $r_s=0,40$  und  $0,45$ ). Entsprechend ist für diese Parameter nicht mit einem klinischen Zusammenhang zu rechnen.

Für das Tetraspanin CD81 ergab sich eine Korrelation zwischen Zellen des *sublinings* und des LL (Abb. 27) bei einem Korrelationskoeffizienten von  $r_s=0,41$ . Jedoch verteilten sich hier nahezu alle eingeschlossenen Gewebe auf einem Wert, sodass eine Interpretation der ermittelten Korrelation sich darauf beschränkt, dass alle Zellen des *lining layers* ein CD81-Signal aufwiesen, wenn auch alle Zellen im *sublining* ein Signal zeigten. Ähnlich zum CD63 könnte auch CD81 in diesen Gewebearealen eine Rolle bei der Migration und Zelladhäsion von Zellen spielen (s. auch Kapitel 5.3.2) und bei der Vermittlung der Migration von Zellen durch *sublining* ins *lining layer* helfen. Um eine weitergehende Interpretation dieser Daten zu rechtfertigen, benötigt es weitere Proben, sowie einen Score mit einer größeren Spannweite, der die Unterschiede besser erfassen kann.

Das Tetraspanin CD151 zeigte, wie auch CD63, Korrelationen zwischen Kernmuster LL vs. Kernmuster EZ sowie Kernmuster LL vs. Kernmuster Media/Adventitia (Abb. 28). Jedoch stellte sich auch bei diesen Korrelationen ein Fokus der meisten Werte auf einem Punkt dar, sodass eine Korrelation und deren Interpretation ebenfalls auf nur eine Aussage beschränkt sind. So zeigte sich, dass, wenn in allen Zellen im *lining layer* eine Kernfärbung zu beobachten war, auch in allen Endothelzellen bzw. in allen Zellen der

Media/Adventitia eine Kernfärbung erkennbar war (jeweils  $r_s=0,44$ ). Auch hier wären mehr Gewebe notwendig, die andere Score-Werte aufweisen, ggf. unter Einbezug von Synovialgewebe gesunder Personen, das jedoch nur schwer zugänglich ist. Für den Zusammenhang Kernmuster EZ vs. Kernmuster Media/Adventitia (Abb. 28) ergab sich eine perfekte Korrelation ( $r_s=1,0$ ), jedoch ließ sich wie auch bei den beiden zuvor beschriebenen Korrelationen eine konzentrierte Werteverteilung erkennen. Daher ergab sich zwar statistisch ein starker Zusammenhang, jedoch ist auch hier die Interpretation eingeschränkt. Dennoch lässt sich, wie auch bei CD63, vermuten, dass, wenn das Kernmuster in einer Struktur des Gewebes stark ausgeprägt ist, dies auch in anderen Strukturen mit starker Ausprägung zu finden ist. Bei der Vermutung, dass CD151 ebenfalls eine Beteiligung bei der Regulierung von Migration und Zelladhäsion zukommt (s. Kapitel 5.3.3), lassen sich Parallelen zu CD63 und CD81 finden. Mit dieser Funktion des CD151 wäre es denkbar, dass hier CD151 sowohl in vielen Endothelzellen sowie in vielen Zellen des *lining layers* und der Media/Adventitia exprimiert wird, um eine Migration von z.B. Entzündungszellen durch die Gefäßwand in das *lining layer* zu vermitteln.

Für die Korrelation Kernmuster Zellen *sublining* vs. Zellausläufer *sublining* (Abb. 28) zeigte sich eine ungleichmäßige Werteverteilung ( $r_s=0,44$ ). Eine Interpretation des Zusammenhangs ist ähnlich zu den vorherigen Korrelationen auf eine Aussage beschränkt. Lässt sich in allen Zellen des *sublinings* ein Kernmuster erkennen, so lässt sich auch eine Färbung aller Zellausläufer im *sublining* beobachten. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass, wenn CD151 in zytoplasmatischen Vesikeln exprimiert wird und die Vesikel in die Zellmembranen integriert werden, diese Membranen auch entlang der Zellausläufer zu finden wären.

Die weiterhin ermittelten Korrelationen Kernmuster Zellen *sublining* vs. Antiphlogistika sowie starke Färbung Endothel vs. Entnahmedatum ergaben jeweils eine breite Streuung der Werte um die Regressionsgerade, sodass graphisch kein linearer Zusammenhang der entsprechenden Kategorien ermittelt werden konnte. Statistisch wurden nach Spearman Korrelationskoeffizienten von 0,45 und -0,49 berechnet, dennoch ist kein Zusammenhang bei den untersuchten Parametern zu erwarten.

Bei der Analyse einer möglichen Korrelation zwischen CD63 und CD81 konnte eine Signifikanz für die zusammengefasste Gruppe aus OA- und RA-Geweben ermittelt werden (Abb. 29). Eingeschlossen wurden die Auswertungskategorien, welche bei den Immunfluoreszenz-Färbungen für beide Tetraspanine untersucht wurden. Es ergaben sich nur fünf gemeinsame Kategorien, sodass der Stichprobenumfang begrenzt war.

Dies ließ keine sinnvolle Interpretation der Zusammenhänge zu. Jedoch konnten die Unterschiede in der Expression der beiden Tetraspanine in verschiedenen Bereichen untersucht werden. So zeigte sich für den Mittelwert aus OA und RA, dass CD81 in *lining layer*, Endothelzellen sowie in Zellen des *sublinings* eine stärker ausgeprägte Expression aufwies als CD63. In Zellen von Media und Adventitia sowie von Infiltraten war die Expression von CD63 und CD81 gleich stark ausgeprägt.

Im Vergleich der beiden Tetraspanine CD63 und CD151 ergab sich eine Korrelation auf einem Signifikanzniveau von 0,05, wenn nur die Ergebnisse der OA-Gewebe beachtet wurden (Abb. 29). Hier konnten zusätzlich zu den Kategorien LL, EZ, Media/Adventitia, Zellen des *sublinings* und Infiltrate die weiteren gemeinsamen Kategorien des Kernmusters berücksichtigt werden. Insgesamt wurden somit zehn Kategorien einbezogen, jedoch war auch dieser Stichprobenumfang zu gering. Wurden die Kategorien im Diagramm einzeln betrachtet, resultierte eine stärker ausgeprägte Expression von CD151 vor allem im Kernmuster von Zellen des *lining layers*, Endothels, *sublinings*, Media und Adventitia und Infiltraten. Generell wiesen die Bereiche von *lining layer*, Endothel, Media und Adventitia sowie *sublining* eine ähnliche Expression auf. In Infiltraten schien CD63 etwas mehr exprimiert zu sein, wobei jedoch der sehr geringe Stichprobenumfang der Gewebe mit Infiltraten (n=7) zu beachten ist.

Generell sollten alle ermittelten Korrelationen aufgrund des Stichprobenumfangs entsprechend kritisch bewertet werden. Es handelt sich hierbei um die Korrelation von Parametern, um mögliche Unterschiede zu identifizieren, die als Hypothesen in späteren Arbeiten geprüft werden müssen. Bei den statistischen Analysen der Ergebnisse, welche im Rahmen dieser Arbeit erarbeitet wurden, konnte nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden. Aus diesem Grund wurden, wie in den Methoden beschrieben, nicht-parametrische Tests angewendet. Da viele der Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied zwischen OA- und RA-Gewebe ergaben, wurden für manche Analysen die Gruppen der OA- und RA-Gewebe zusammengefasst, um einen größeren Stichprobenumfang zu ermöglichen. Bei Interpretationen, die sich aus diesen Analysen ergaben, muss beachtet werden, dass Aussagen sich generell auf Gewebe mit entzündlichen bzw. degenerativen Prozessen, nicht aber auf die Erkrankungen der OA bzw. RA übertragen lassen. Mit den durchgeführten statistischen Analysen wurde das Ziel dieser Arbeit verfolgt, erste Ergebnisse zu der Expression von Tetraspanine aufzuzeigen und Anhaltspunkte für die weitere Erforschung zu schaffen.

## 5.7 Tetraspanin-Expression in stimulierten Fibroblasten

Einen bedeutenden Faktor bei der Progression der RA und der Destruktion von Gelenken stellt die Aktivierung von synovialen Fibroblasten durch verschiedene proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 oder TNF $\alpha$  dar [4, 29]. Diese nehmen eine Schlüsselrolle ein, indem sie Mediatoren wie Zytokine und Chemokine, welche die Entzündung aufrechterhalten, sowie Proteasen, welche zur Knorpelzerstörung beitragen, bilden [9, 11]. Dabei weisen sie in ihrem Verhalten einige Merkmale auf, welche auch bei Tumorzellen beobachtet werden konnten. So wurde nachgewiesen, dass RASF die Fähigkeit besitzen, ihren eigentlichen Zellverband zu verlassen und durch Gewebe zu entfernten Gewebearealen zu migrieren [10, 29, 108]. Tetraspanine wurden im Rahmen verschiedener Tumorerkrankungen bereits vielfach untersucht und migrationsfördernde oder -hemmende Einflüsse aufgezeigt (s. Kapitel 1.4.4 bis 1.4.7) [41]. Über die Rolle der Tetraspanine und deren Expression in den für die RA bedeutenden synovialen Fibroblasten ist noch wenig bekannt. In der vorherigen Studie der Arbeitsgruppe zum Tetraspanin CD82 konnte im Vergleich zu OA-synovialen Fibroblasten bereits eine erhöhte Expression in RA-synovialen Fibroblasten nachgewiesen werden [29]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Expression der Tetraspanine CD63, CD81 und CD151 in RASF verglichen mit OASF und im Zusammenhang mit einem proentzündlichen Stimulus untersucht.

In kultivierten RASF sollte überprüft werden, ob proentzündliche Faktoren die Expression der untersuchten Tetraspanine induziert und ob Unterschiede in der Tetraspanin-Expression zwischen RASF und OASF bestehen. Hierzu wurden RASF mit den Entzündungszytokinen IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  stimuliert und zeigten eine deutliche proentzündliche Reaktion in Form einer Proteininduktion von IL-6 im Vergleich zur unstimulierten Kultur auf. Wie früher schon gezeigt, erfolgte insbesondere eine durch IL-1 $\beta$  induzierte Expression von IL-6 [116, 117].

Im Vorfeld wurde eine Messung der proentzündlichen Reaktion der RASF durchgeführt. Hierbei und auch bei den Expressionsanalysen zu den Tetraspaninen fielen einzelne Populationen auf, die in einer Analyse stark von den anderen Populationen abwichen. Zu diesen Abweichungen ließen sich jedoch in anderen Expressionsanalysen keine Korrelate finden, sodass für diese Populationen generell keine sich abgrenzenden Eigenschaften vermutet wurden und kein Hinweis zum Ausschluss identifiziert werden konnte. Somit lässt sich eine besonders starke Reaktion einiger Populationen wahrscheinlich auf die natürliche Varianz bei Stimulierungen zurückführen, welche sich auf einer unterschiedlichen Zellzahl pro Kulturplatte sowie einer stark

patientenabhängigen Reaktivität der Zellen begründet. Diese Variabilität spiegelte sich auch in den Ergebnissen der Tetraspaninexpressionen wider.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit je fünf Populationen von OASF und RASF in die Stimulationsversuche eingeschlossen. OASF als Vergleichsgruppe wurden gewählt, um eine Vergleichbarkeit zur parallelen histologischen Auswertung zu ermöglichen. Es konnte nicht von einer Normalverteilung der generierten Daten ausgegangen werden, sodass nicht-parametrische Tests für die statistischen Analysen eingesetzt wurden. Bei den durchgeführten Analysen wurde das Ziel verfolgt, erste Ergebnisse zu einer möglichen Induktion der Tetraspanin-Expression in RASF durch proentzündliche Faktoren sowie zu möglichen Unterschieden in der Tetraspanin-Expression zwischen RASF und OASF aufzuzeigen und Anhaltspunkte für die weitere Erforschung zu schaffen. Die durch diesen Ansatz bedingte geringe Stichprobenanzahl und die damit einhergehende breite Streuung bei den Tetraspanin-Expressionsanalysen führen dazu, dass die Ergebnisse der Tetraspanin-Expressionen in den Fibroblastenstimulierungen kritisch bewertet werden sollte. Eine möglicherweise veränderte Tetraspanin-Expression in RASF und eine Beteiligung der Tetraspanine im Krankheitsgeschehen der RA ist somit nicht ausgeschlossen und die Ergebnisse sollten beispielsweise durch eine Stichprobenumfangvergrößerung weiter geprüft werden.

### **5.7.1 Expression des Tetraspanins CD63**

Die bei Expressionsanalysen zu CD63 für 17 h mit IL-1 $\beta$  stimulierten RASF zeigten durchschnittlich eine nicht signifikante und nur leicht reduzierte CD63-Expression gegenüber der unstimulierten RASF-Kultur. TNF $\alpha$  stimulierte RASF dagegen wiesen eine signifikante und stärkere Reduktion der CD63-Expression verglichen mit durch IL-1 $\beta$  stimulierten sowie unstimulierten RASF auf. Dies würde auf eine Reduktion von CD63-Expression bei im Rahmen eines Entzündungsprozesses aktivierten RASF hinweisen. Zu beachten ist allerdings, dass die RASF für 17 Stunden stimuliert wurden. Nicht auszuschließen ist also, dass der Vorgang der Reduktion der CD63-Expression bereits durch eine Gegenregulation abgeschwächt ist. Um dies zu überprüfen, wurden dreistündige Stimulierungen durchgeführt. Durch IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  erhöhte sich die CD63-Expression bei RASF nach drei Stunden im Schnitt, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Die Ergebnisse der dreistündigen Stimulierung lassen vermuten, dass es im Rahmen eines Entzündungsgeschehens bei aktivierten RASF zunächst zu einer Induktion der CD63-Expression und im zeitlichen Verlauf zu einer Gegenregulation kommt, sodass die CD63-Expression nach 17 Stunden reduziert ist. Dies würde der Kinetik vieler Membranproteine entsprechen, bei der durch einen Entzündungsstimulus

eine zeitlich limitierte Expression und Proteinproduktion induziert wird, die dann wieder reduziert wird. Um dies zu prüfen, sind jedoch höhere Fallzahlen und weitere Stimulationszeitpunkte notwendig. Da das Tetraspanin CD63 bei vielen Vorgängen, welche auch im Prozess der Entzündung von Bedeutung sind, eine Rolle spielt [34, 60, 62, 63], lässt sich der Grund für die beobachteten Veränderungen somit schwer ermitteln. Eine Hochregulierung könnte im Sinne einer Beteiligung an Signalwegen, Sekretionsprozessen, Proliferation, Differenzierung, Migrationsvorgängen sowie der Regulierung von Zelladhärenzen durch Organisation verschiedener Integrine oder dem Überleben der Zellen erfolgen, wie sie bereits in anderen Studien zu CD63 beobachtet wurden (s. Kapitel 1.4.5). Diese könnte nach der erfolgten ersten Entzündungsreaktion wieder reduziert und sogar gehemmt werden, um beispielsweise im Bereich der Destruktion ein Verlassen von entzündungs- und krankheitsfördernden Zellen zu verhindern.

Bei der dreistündigen Stimulation von OASF ließ sich ebenso kein signifikanter Unterschied durch die entzündliche Stimulierung erzielen (s. Abb. 32). Eine leichte Erhöhung durch IL-1 wird hauptsächlich durch eine Population induziert. Ohne diese Population würde durchschnittlich einen arithmetischen Mittelwert von einer 0,79-fach reduzierten CD63-Expression bei den IL-1 $\beta$  stimulierten OASF sowie einer 1,22-fach höheren CD63-Expression bei TNF $\alpha$  stimulierten OASF im Vergleich zur unstimulierten OASF-Kultur ergeben. Dies würde im Vergleich zu dreistündig stimulierten RASF bei den OASF eine reduzierte statt erhöhter CD63-Expression für Stimulation mit IL-1 $\beta$  sowie eine etwas reduzierte CD63-Expression für die TNF $\alpha$  stimulierten OASF aufzeigen. Ein solcher Unterschied zwischen OA und RA könnte für den Fall, dass die Ergebnisse bei weiteren Untersuchungen bestätigt werden, auf unterscheidende Prozesse während der Entzündung bei der RA zurückzuführen sein. Um Ursache und Wirkung einer möglichen Induktion der CD63-Expression nach Entzündungsreiz nachzugehen, werden weitere Untersuchungen benötigt. Aufgrund der limitierten Fallzahl und der limitierten Anzahl an Stimulationszeitpunkten ist eine klare Aussage nicht möglich, weist jedoch auf eine komplexe Expressionskinetik der Membranproteine hin.

### **5.7.2 Expression des Tetraspanins CD81**

Für das Tetraspanin CD81 ergaben sich bei den Stimulationsversuchen durchschnittlich sowohl bei 17-stündiger als auch bei dreistündiger Stimulierung der RASF für beide Entzündungszytokine erhöhte, nicht signifikante CD81-Expressionen verglichen mit der

unstimulierten RASF-Kultur. Auch hier reagierten nicht alle Populationen mit erhöhter CD81-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kultur. Eine breite Streuung fiel vor allem bei Stimulation mit TNF $\alpha$  auf. In der Gruppe der dreistündig mit TNF $\alpha$  stimulierten RASF zeigte sich ebenfalls eine breite Streuung mit reduzierten als auch erhöhten CD81-Expressionen der einzelnen Populationen (s. Abb. 34). Eine Population reagierte bei proentzündlicher Stimulierung mit einer Hochregulierung von CD81, daher stellt sich die Frage, ob diese Population generell leichter mit einer Tetraspanininduktion reagiert. Ein Grund zum Ausschluss dieser Population lag nicht vor. Die Subgruppenanalyse ohne diese Population ergab einen arithmetischen Mittelwert einer 0,65-fach reduzierten CD81-Expression bei IL-1 $\beta$  stimulierten RASF und eine 2,10-fach höhere Expression für TNF $\alpha$  stimulierte RASF im Vergleich mit der unstimulierten Kultur. Für die dreistündig stimulierten OASF ließ sich zwar durchschnittlich eine erhöhte CD81-Expression verglichen mit der unstimulierten OASF-Kultur feststellen, die jedoch nur auf einer stark induzierten Population basiert (s. Abb. 34). Führte man auch hier eine Subgruppenanalyse durch, so resultierte eine durchschnittlich 0,41-fache Reduktion der CD81-Expression bei IL-1 $\beta$  stimulierten sowie eine 0,39-fach reduzierte Expression bei TNF $\alpha$  stimulierten OASF im Vergleich mit der unstimulierten RASF-Kultur. Somit würden OASF mit einer stärkeren Reduktion der CD81-Expression auf proentzündliche Faktoren reagieren als RASF. Da ein begründeter Ausschluss von Populationen nicht gerechtfertigt werden konnte, ist eine solche Vermutung spekulativ und bedarf weiterer Prüfung. Weitere Untersuchungen und eine Stichprobenerweiterung sowie Erweiterung der Expressionskinetik sind von Interesse, da auch das Tetraspanin CD81 mit seinen bisher erforschten Beteiligungen in Zellvorgängen [31, 43, 74, 75, 78] in der RA und den synovialen Fibroblasten eine Rolle spielen könnte (s. Kapitel 5.3.2 und 5.5).

### **5.7.3 Expression des Tetraspanins CD151**

Im Rahmen der RASF-Stimulationsversuche zum Tetraspanin CD151 konnte bei einer Stimulationsdauer von 17 Stunden eine durchschnittlich reduzierte CD151-Expression für die Stimulation mittels IL-1 $\beta$  und eine minimal erhöhte Expression bei Stimulierung mittels TNF $\alpha$  im Vergleich zu unstimulierten RASF festgestellt werden, die jeweils nicht statistisch signifikant waren. Zu beachten ist erneut eine breite Streuung der einzelnen Populationen. So lagen bei beiden Stimulierungsfaktoren sowohl Populationen mit erhöhter als auch Populationen mit reduzierter CD151-Expression vor. Weiterhin auffallend war eine nach oben abweichende Expression für eine Population (s. Abb. 35), die bereits bei der Messung der proentzündlichen Reaktion mit einer, verglichen mit den anderen vier Populationen, sehr starken Expression von IL-6 nach Stimulation mit IL-1 $\beta$

auffiel (s. Abb. 30). Dies weist möglicherweise auf eine Abhängigkeit der Induktion mit der Reaktivität der einzelnen Zellpopulation hin. Ohne Einbeziehung dieser Population würde die CD151-Expression für beide Stimulierungsvarianten niedriger ausfallen, jedoch ergab sich wie zuvor kein Anhalt, diese Population auszuschließen. Bei der dreistündigen Stimulation zeigten sich im Vergleich zur unstimulierten Kultur eine reduzierte CD151-Expression bei IL-1 $\beta$  stimulierten und eine höhere Expression bei TNF $\alpha$  stimulierten RASF. Diese basiert jedoch lediglich auf einer Population, die eine sehr große Differenz zu allen in dieser Arbeit mittels Real-Time-PCR ermittelten Ergebnissen aufwies, bei der aber kein Grund für die unterschiedlicher Reaktivität ersichtlich war. Wird eine Subgruppenanalyse ohne die Population durchgeführt, ergab sich eine 0,70-fach reduzierte CD151-Expression für IL-1 $\beta$  stimulierte und eine 0,68-fach reduzierte Expression für TNF $\alpha$  stimulierte RASF verglichen mit der unstimulierten RASF-Kultur. Vor allem für die Gruppe der mittels TNF $\alpha$  stimulierten RASF wies eine solche Subgruppenanalyse einen bedeutenden Unterschied auf, sodass eine Vergrößerung des Stichprobenumfangs zur Identifizierung möglicher Expressionsunterschiede notwendig wäre.

Bei Betrachtung aller Populationen ließ sich auf einen Entzündungsreiz mit IL-1 $\beta$  bei den RASF eine Reduktion der CD151-Expression ohne darauffolgende Gegenregulation nach 17 Stunden feststellen. Bei Stimulierung mit TNF $\alpha$  zeigten RASF zunächst eine starke Induktion der CD151-Expression, gefolgt durch eine Gegenregulation auf ein der unstimulierten RASF-Kultur entsprechendes Expressionsniveau. Könnte man die Subgruppenanalyse rechtfertigen, ergäbe sich für beide Entzündungszytokine zunächst eine Reduktion der CD151-Expression bei den RASF, welcher anschließend eine Regulation entgegengewirkt, sodass sich nach 17 Stunden bereits teilweise eine Normalisierung auf ein Expressionsniveau der Vergleichsgruppe eingestellt hätte. Diese Vermutung ist aufgrund bereits erwähnter Aspekte spekulativ und bedarf weiterer Prüfung. Für die dreistündig stimulierten OASF konnte im Vergleich zur unstimulierten Kultur eine durchschnittlich gleichbleibende CD151-Expression nach Stimulierung mittels IL-1 $\beta$  sowie einer gesteigerten Expression bei mittels TNF $\alpha$  stimulierten OASF beobachtet werden. Dabei ließ sich eine breite Streuung mit jeweils reduzierten und erhöhten Expressionsniveaus der Populationen im Vergleich zur unstimulierten OASF-Kultur beobachten. Dies würde nach Entzündungsreiz mittels IL-1 $\beta$  keine veränderte CD151-Expression bei OASF und eine Reduktion bei RASF aufzeigen, während eine TNF $\alpha$ -Stimulation eine Induktion der Expression auf beiden Seiten von OASF und RASF bewirken würde. Da das Tetraspanin CD151 mit den bereits nachgewiesenen

Beteiligungen an Zellvorgängen wie der Aufrechterhaltung einer normalen zellulären Integrität, Zellkommunikation, Zellmotilität, Angiogenese sowie der Rolle bei Metastasierungsvorgängen im Rahmen von Tumorerkrankungen [81, 83–86] ebenfalls im Krankheitsgeschehen der RA und im besonderen Maß bei synovialen Fibroblasten von Bedeutung sein könnte, würden weitere Untersuchungen und eine Stichprobenerhöhung und einer detaillierten Zeitkinetik einen erweiterten Einblick verschaffen.

### **5.8 Erkenntnisse zu den Tetraspaninen CD63, CD81 und CD151**

Die Experimente, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten, dass die Tetraspanine CD63, CD81 und CD151 im Synovium sowohl von RA als auch von OA exprimiert werden. Mit Nachweis der Expression in *lining layer*, *sublining* und Gefäßen bestätigte sich die ubiquitäre Verteilung der Tetraspanine. Unterschiede zwischen OA und RA ließen sich bezüglich Verteilungsmuster der Tetraspanine in den Gewebearealen nicht feststellen. Da für alle untersuchten Tetraspanine eine Beteiligung bei der Vermittlung von Zellmigration und -adhäsion vermutet werden kann (s. auch Kapitel 5.3.1 bis 5.3.3), würde hierbei eine Expression auf vielen Zellen der Gefäßwand, des *sublinings* und des *lining layers* eine Migration von beispielsweise Entzündungszellen in das *lining layer* ermöglichen. So zeigten auch einige der durchgeführten Korrelationen den Zusammenhang, dass, wenn in manchen Gewebearealen viele Zellen ein Tetraspanin exprimierten, dieses auch in vielen Zellen anderer Areale exprimiert wurde.

Zwar konnte für die Tetraspanine bezüglich des Verteilungsmusters im Gewebe kein Unterschied ermittelt werden, jedoch ergab die Auswertung der zellulären Signalintensität der Tetraspaninsignale im *sublining* Unterschiede zwischen OA und RA. So zeigten sich im Vergleich zur OA für die RA Hinweise auf eine erhöhte Expression von CD63, eine reduzierte Expression von CD81 sowie eine gleiche Expression von CD151. Dies könnte erste Hinweise auf unterschiedliche oder sogar entgegengesetzte Funktionen der Tetraspanine aufzeigen. Hierbei wäre auch eine Untersuchung der Signalintensität der Tetraspaninsignale in den weiteren Gewebearealen *lining layer* und in den Gefäßen hinsichtlich einer Bestätigung oder eines Abweichens der Ergebnisse interessant.

Differenzen zwischen den Tetraspaninen konnten außerdem in der Expressionsverteilung innerhalb der Zelle festgestellt werden. Während CD81 eine Expression außerhalb des Zellkernbereichs zeigte, konnte für die Tetraspanine CD63 und CD151 isolierte Signale der markierenden Antikörper innerhalb des Zellkernbereichs

von Zellen beobachtet werden. Die Identifizierung der exprimierenden Zellen und die genaue Lokalisation der Tetraspanin-Expression sollten weitere Erkenntnisse über die Funktion der Tetraspanine ermöglichen. Interessant wären neben der konfokalen Mikroskopie zum Tetraspanin-Nachweis die Etablierung weiterer Doppel- und Mehrfachfärbungen zur Charakterisierung von Ansammlungen der Tetraspanine in Zellkompartimenten und der Zellmembran, insbesondere in den Bereich der TEMs. Dies könnte ebenfalls weiteren Aufschluss darüber geben, ob die Tetraspanine CD63, CD81 und CD151 zueinander konträr oder kolokalisiert sind.

Auf RNA-Ebene zeigten sich erste Hinweise auf eine komplexe Regulationskinetik nach proentzündlicher Stimulation von RASF. Für das Tetraspanin CD63 ließ sich die Tendenz erkennen, dass es zunächst zu einer Induktion der CD63-Expression kommt und diese anschließend möglicherweise durch eine Gegenregulation reduziert wird. Dies käme einer kurzfristig und stark regulierten Membranprotein-Kinetik gleich und ließe sich mit der Vermutung vereinbaren, dass ein Tetraspanin im Rahmen eines Entzündungsgeschehens vermehrt exprimiert werden könnte, um z.B. bei der Migration von Entzündungszellen ins entzündete Gewebe zu vermitteln und so zur Pathogenese der RA beizutragen. Um die Kinetik der Tetraspaninexpression zu untersuchen, werden weitere Untersuchungen und eine Erweiterung der Populationsanzahl erfolgen. Hinzu kommt, dass Adhäsionsmoleküle und deren Adapterproteine oftmals nicht nur durch Neusynthese regulatorisch wirken, sondern auch durch eine veränderte Lokalisation auf der Zellmembran, die z.B. zur veränderten Zellmotilität führt.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Die rheumatoide Arthritis, eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung, verläuft progredient und führt ohne Behandlung zur Zerstörung von Gelenken und letztendlich zur Invalidität [1, 2]. Die Pathophysiologie dieser Erkrankung ist noch nicht umfassend aufgeklärt. Einen wichtigen Prozess für die Progredienz der RA stellt dabei die Ausbreitung auf gesunde Gelenke und Gewebe dar [1]. Solch ein Vorgang ist ebenso bei der Metastasierung von Tumorerkrankungen zu beobachten. Im Rahmen der Tumorforschung wurden daher bereits Tetraspanine hinsichtlich einer Beteiligung im Krankheitsgeschehen untersucht [41]. Mitglieder der Tetraspaninfamilie mit ihrer Fähigkeit, über Tetraspanin-angereicherte Mikrodomänen wichtige Zellvorgänge wie beispielsweise die Signaltransduktion, Zellproliferation und -migration zu regulieren [27, 28, 33, 37–39], zeigten dabei sowohl pro-metastatische als auch hemmende Einflüsse auf Metastasierungsvorgänge [41]. Diese Migrationseinflüsse der Tetraspanine könnten auch in der Pathogenese der RA von Bedeutung sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Expression der Tetraspanine CD63, CD81 und CD151 im Synovium von Patienten mit RA im Vergleich zur Arthrose untersucht. Immunfluoreszenz-Färbungen wurden für die Tetraspanine etabliert und ein Profil der Verteilungsmuster und Expressionsintensitäten erarbeitet. Es stellte sich eine ubiquitäre Verteilung der drei Tetraspanine in Zellen von *lining layer*, *sublining* und Gefäßen dar. Signifikante Unterschiede zwischen RA-Geweben mit Vergleichsgeweben von Patienten mit Arthrose konnten nicht nachgewiesen werden. Während die drei Tetraspanine sich bezüglich der Verteilung zwischen den Arealen *lining layer*, *sublining* und Gefäßen nicht unterschieden, konnten bezüglich der Expressionsverteilung innerhalb der Zelle Differenzen zwischen den Tetraspaninen festgestellt werden. CD81 zeigte eine Expression außerhalb des Zellkernbereichs. Für die Tetraspanine CD63 und CD151 konnten weiterhin isolierte Signale der markierenden Antikörper innerhalb des Zellkernbereichs beobachtet werden. Diese Signale fanden sich vereinzelt in allen Gewebearealen und waren besonders bei entzündlichen Infiltraten in nahezu allen Zellen nachweisbar. Eine genauere Lokalisation konnte mittels der durchgeführten Immunfluoreszenz ohne dreidimensionale Darstellung aber nicht erzielt werden. Weitere Erkenntnisse über die Identifizierung der exprimierenden Zellen und die genaue Lokalisation der Tetraspanin-Expression könnten hierbei andere Methoden wie beispielsweise eine konfokale Mikroskopie liefern.

Weiterhin wurde die Expression der Tetraspanine CD63, CD81 und CD151 in synovialen Fibroblasten untersucht, welchen eine Schlüsselrolle bei der Progression der RA und der Destruktion von Gelenken zukommt [9, 11]. Durch eine Fibroblastenstimulierung mit proentzündlichen Faktoren sollte ein erster Einblick in das Expressionsverhalten der Tetraspanine ermöglicht werden. Mit einem Stichprobenumfang von je fünf Zellpopulationen für RASF und OASF zeigte sich wie erwartet eine große individuelle Streuung bezüglich der Tetraspanin-Expression zwischen den Populationen, sodass entsprechende oder signifikante Unterschiede schwer nachzuweisen waren. Für das Tetraspanin CD63 ließ sich jedoch die Tendenz erkennen, dass es bei im Rahmen eines Entzündungsgeschehens aktivierten RASF zunächst zu einer Induktion der CD63-Expression kommt, die Expression aber anschließend möglicherweise durch eine Gegenregulation reduziert wird.

In dieser Arbeit ergaben sich Hinweise, dass Tetraspanine bei der Pathogenese der RA eine Relevanz haben könnten. Eine veränderte Oberflächenverteilung der Tetraspanine in TEMs könnte dazu führen, dass Zellen wie insbesondere synoviale Fibroblasten rekrutiert werden, aktiv in den Knorpel invadieren und vor Ort gehalten werden.

## 7. SUMMARY

Rheumatoid arthritis (RA), a chronic inflammatory systemic disease, is progressive and, if left untreated, leads to the destruction of joints and ultimately to disability [1, 2]. The pathophysiology of this disease has not yet been fully elucidated. An important process for the progression of RA is the spread to healthy joints and tissue [1]. Such a process can also be observed in the metastasis of tumor diseases. In the context of tumor research, tetraspanins have already been examined with regard to their involvement in disease processes [41]. Some members of the tetraspanin family, which have been demonstrated to possess the ability to regulate important cell processes such as signal transduction, cell proliferation and cell migration via tetraspanin-enriched microdomains [27, 28, 33, 37-39], showed both pro-metastatic and inhibitory effects on metastatic processes [41]. These migration influences of the tetraspanins could also be of importance in the pathogenesis of RA.

Therefore, within the scope of this work, the expression of the tetraspanins CD63, CD81 and CD151 in the synovium of patients with RA was examined in comparison to osteoarthritis. Immunofluorescence staining was established for the tetraspanins and a profile of the distribution pattern and expression intensities was developed. A ubiquitous distribution of the three tetraspanins in cells of the lining layer, sublining and vessels was found. Significant differences between RA tissue and reference tissue from patients with osteoarthritis could not be demonstrated. While the three tetraspanins did not differ with regard to the distribution between the areas lining layer, sublining and vessels, differences between the tetraspanins could be determined with regard to the distribution of expression within the cell. CD81 showed expression outside the cell nucleus. For the tetraspanins CD63 and CD151, isolated signals of the labeling antibodies could also be observed within the nucleus of cells. These signals were found sporadically in all tissue areas and were detectable in almost all cells, particularly in the case of inflammatory infiltrates. However, a more precise localization could not be achieved using immunofluorescence without three-dimensional imaging. Other methods such as confocal microscopy might provide further insights into the identification of the expressing cells and the exact localization of the tetraspanin expression.

Furthermore, the expression of the tetraspanins CD63, CD81 and CD151 in synovial fibroblasts, which play a key role in the progression of RA and the destruction of joints, was examined [9, 11]. Fibroblast stimulation with pro-inflammatory factors should provide a first insight into the expression behavior of tetraspanins. A sample size of five

cell populations each for RASF (rheumatoid arthritis synovial fibroblasts) and OASF (osteoarthritis synovial fibroblasts) showed highly diverse scattering patterns, which made it difficult to detect differences and common features between the populations. However, for the tetraspanin CD63 there was a tendency that in the context of an inflammatory process activated RASF initially leads to the induction of CD63 expression, but might subsequently be reduced by counterregulation.

This work provided indications for the relevant of tetraspanins in the pathogenesis of RA. An altered surface distribution of tetraspanins in TEMs (tetraspanin-enriched microdomains) could lead to cells such as synovial fibroblasts in particular being recruited to actively invade the cartilage and be held in this location.

## 8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|       |   |
|-------|---|
| AEC   | 3-Amino-9-ethylcarbazol (Chromogen)                   |
| AK    | Antikörper  |
| BSA   | bovines Serumalbumin                                  |
| BSG   | Blutsenkungsgeschwindigkeit                           |
| CAM   | <i>cell adhesion molecules</i>                        |
| CCP   | zyklisch zitruiniertes Peptid                         |
| CD    | <i>cluster of differentiation</i>                     |
| cDNA  | komplementäre DNA                                     |
| CRP   | C-reaktives Protein                                   |
| Cy3   | Indocarbocyanin (Fluorochrom)                         |
| DAPI  | 4',6-Diamidin-2-phenylindol                           |
| DIP   | distales Interphalangealgelenk                        |
| DMARD | <i>Disease-modifying Antirheumatic Drug</i>           |
| DMEM  | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>             |
| DNA   | Desoxyribonukleinsäure                                |
| EC    | extrazelluläre Domäne                                 |
| EGFR  | epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor                  |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>              |
| EPEC  | enteropathogenes Escherichia coli                     |
| ERM   | Aktin-bindende Proteine                               |
| EtOH  | Ethanol   |
| EZ    | Endothelzellen  |
| FB    | Fibroblasten  |
| FGFR  | Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor                 |
| FITC  | Fluoresceinisothiocyanat (Fluorochrom)                |
| H/E   | Hämatoxylin-Eosin-Färbung                             |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HRP   | <i>horseradish peroxidase</i>                         |
| IF    | Immunfluoreszenz                                      |
| IHC   | Immunhistochemie                                      |
| IL    | Interleukin   |
| ISO   | Isotypkontrolle                                       |
| JAK   | Januskinase   |

|       |  |
|-------|--|
| LL    | <i>lining layer</i>                    |
| MCP   | Metacarpophalangealgelenk              |
| mRNA  | <i>messenger RNA</i>                   |
| MRT   | Magnetresonanztherapie                 |
| MTP   | Metatarsophalangealgelenk              |
| NK    | Negativkontrolle                       |
| NSAR  | nicht-steroidale Antirheumatika        |
| OA    | Arthrose, engl. <i>osteoarthritis</i>  |
| OASF  | OA-synoviale Fibroblasten              |
| PBS   | phosphatgepufferte Salzlösung          |
| PCR   | Polymerase-Kettenreaktion              |
| PI4K  | Phosphoinositid-4-Kinase               |
| PIP   | proximales Interphalangealgelenk       |
| PKC   | Proteinkinase C                        |
| RA    | rheumatoide Arthritis                  |
| RASF  | RA-synoviale Fibroblasten              |
| RNA   | Ribonukleinsäure                       |
| rRNA  | ribosomale RNA                         |
| RT    | Raumtemperatur                         |
| TEM   | Tetraspanin-angereicherte Mikrodomänen |
| TM    | Transmembransegment                    |
| TNF   | Tumornekrosefaktor                     |
| Tspan | Tetraspanin                            |

## 9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|   |    |
|---|----|
| Abb. 1: Schematische Darstellung eines humanen Gelenks mit gesundem Synovium..          | 2  |
| Abb. 2: Schematische Darstellung eines RA-Gelenks.....                                  | 5  |
| Abb. 3: Schematische Darstellung eines Tetraspanins .....                               | 18 |
| Abb. 4: Darstellung einer Tetraspanin-angereicherten Mikrodomäne.....                   | 19 |
| Abb. 5: Darstellung der definierten Synoviumareale anhand eines Beispiels .....         | 48 |
| Abb. 6: Beispiel der Zuteilung von Score-Werten anhand des Areal <i>sublining</i> ..... | 50 |
| Abb. 7: Beispiel des Färbemusters im Kernbereich sowie der Aussparung .....             |    |
| der CD63-Färbung innerhalb der Gefäßwand (Spezialkategorien der .....                   |    |
| Immunfluoreszenz-Auswertung) .....  | 51 |
| Abb. 8: Beispiel der stärkeren CD81-Färbung des Endothels im Vergleich zur Media.....   |    |
| bzw. Adventitia (Spezialkategorie der Immunfluoreszenz-Auswertung) .....                | 52 |
| Abb. 9: Beispiel des Färbemusters im Kernbereich, der starken CD151-Färbung.....        |    |
| in Zellausläufern sowie der stärkeren CD151-Färbung des Endothels im .....              |    |
| Vergleich zur Media (Spezialkategorien der .....  |    |
| Immunfluoreszenz-Auswertung) .....  | 53 |
| Abb. 10: Beispiel der unterschiedlichen Signalstärke des CD63-Antikörpers .....         |    |
| zwischen zwei Gewebeproben bei der Immunhistochemie .....                               | 62 |
| Abb. 11: Durchschnittliche Score-Werte der Immunfluoreszenz- .....                      |    |
| Auswertungskategorien für CD63 .....  | 64 |
| Abb. 12: Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbung eines Gewebes für CD63 .....           | 67 |
| Abb. 13: Durchschnittliche Score-Werte der Immunfluoreszenz- .....                      |    |
| Auswertungskategorien für CD81 .....  | 73 |
| Abb. 14: Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbung eines Gewebes für CD81 .....           | 75 |
| Abb. 15: Durchschnittliche Score-Werte der Immunfluoreszenz- .....                      |    |
| Auswertungskategorien für CD151 .....   | 82 |
| Abb. 16: Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbung eines Gewebes für CD151 .....          |    |
| (Teil 1) .....  | 83 |
| Abb. 17: Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbung eines Gewebes für CD151 .....          |    |
| (Teil 2) .....  | 84 |
| Abb. 18: Bilder der besten Etablierungsvariante für die CD9-Immunhistochemie.....       | 89 |
| Abb. 19: Ergebnis der Expressionsverteilung für die Antikörper-Signale bei der .....    |    |
| Doppel-Immunfluoreszenz von CD81 und CD151 in der Kategorie .....                       |    |
| <i>lining layer</i> .....   | 91 |

|  |     |
|--|-----|
| Abb. 20: Ergebnis der Expressionsverteilung für die Antikörper-Signale bei der<br>Doppel-Immunfluoreszenz von CD81 und CD151 in den Gefäßen .....          | 92  |
| Abb. 21: Ergebnis der Expressionsverteilung für die Antikörper-Signale bei der<br>Doppel-Immunfluoreszenz von CD81 und CD151 im <i>sublining</i> .....     | 93  |
| Abb. 22: Repräsentative Doppel-IF-Färbung eines Gewebes für CD81/CD151 .....   | 95  |
| Abb. 23: Durchschnittliche Anteile der im Rahmen der CD63-Immunfluoreszenz<br>im <i>sublining</i> stark und schwach positiv gefärbten Zellen an der .....  | 97  |
| Abb. 24: Durchschnittliche Anteile der im Rahmen der CD81-Immunfluoreszenz<br>im <i>sublining</i> stark und schwach positiv gefärbten Zellen an der .....  | 98  |
| Abb. 25: Durchschnittliche Anteile der im Rahmen der CD151-Immunfluoreszenz<br>im <i>sublining</i> stark und schwach positiv gefärbten Zellen an der ..... | 99  |
| Abb. 26: Als signifikant berechnete Korrelationen zwischen .....   | 105 |
| Abb. 27: Als signifikant berechnete Korrelationen zwischen .....   | 106 |
| Abb. 28: Als signifikant berechnete Korrelationen zwischen .....   | 107 |
| Abb. 29: Als signifikant berechnete Korrelationen zwischen .....   | 108 |
| Abb. 30: IL-6-Expression der RASF-Populationen nach Stimulierung .....   | 109 |
| Abb. 31: CD63-Expression der RASF nach 17-stündiger Stimulierung .....   | 110 |
| Abb. 32: CD63-Expression OASF und RASF nach dreistündiger Stimulierung .....   | 111 |
| Abb. 33: CD81-Expression RASF nach 17-stündiger Stimulierung .....   | 112 |
| Abb. 34: CD81-Expression OASF und RASF nach dreistündiger Stimulierung .....   | 113 |
| Abb. 35: CD151-Expression RASF nach 17-stündiger Stimulierung .....  | 114 |
| Abb. 36: CD151-Expression OASF und RASF nach dreistündiger Stimulierung .....  | 115 |

## 10. TABELLARISCHER ANHANG

|   |    |
|---|----|
| Tab. 1: ACR/EULAR Klassifikationskriterien der rheumatoiden Arthritis.....          | 9  |
| Tab. 2: Einfluss von CD9 bei der Migration und Metastasierung von Tumorzellen ..... | 21 |
| Tab. 3: Einfluss von CD63 bei der Migration und Metastasierung von Tumorzellen .... | 22 |
| Tab. 4: Einfluss von CD81 bei der Migration und Metastasierung von Tumorzellen .... | 23 |
| Tab. 5: Einfluss von CD151 bei der Migration und Metastasierung von Tumorzellen ..  | 24 |
| Tab. 6: Verwendete allgemeine Chemikalien, Reagenzien und Materialien .....         | 26 |
| Tab. 7: Für Hämatoxylin-Eosin-Färbung verwendete Reagenzien .....                   | 26 |
| Tab. 8: Verwendete Blocklösungen.....   | 27 |
| Tab. 9: Für den ELISA verwendete Materialien und Substanzen .....                   | 27 |
| Tab. 10: Für die RNA-Isolation verwendete Materialien und Substanzen.....           | 27 |
| Tab. 11: Für die cDNA-Synthese verwendete Materialien und Substanzen .....          | 27 |
| Tab. 12: Für die Real-Time-PCR verwendete Materialien und Substanzen.....           | 27 |
| Tab. 13: Verwendete Primärantikörper .....  | 28 |
| Tab. 14: Verwendete Sekundärantikörper.....   | 28 |
| Tab. 15: Verwendete Isotypkontrollen.....   | 29 |
| Tab. 16: Verwendete Primer .....  | 29 |
| Tab. 17: Für Zellkultur verwendete Materialien und Substanzen.....                  | 29 |
| Tab. 18: Für die Zellkultur verwendete Lösungen .....                               | 29 |
| Tab. 19: Verwendete Geräte und Programme .....                                      | 30 |
| Tab. 20: Allgemeines Immunhistochemie-Protokoll.....                                | 33 |
| Tab. 21: Allgemeines Immunfluoreszenz-Protokoll .....                               | 36 |
| Tab. 22: Für die CD63-Immunfluoreszenz etablierte Substanzen und .....              |    |
| Konzentrationen.....  | 37 |
| Tab. 23: Für die CD81-Immunfluoreszenz etablierte Substanzen und .....              |    |
| Konzentrationen.....  | 37 |
| Tab. 24: Für die CD151-Immunfluoreszenz etablierte Substanzen und .....             |    |
| Konzentrationen.....  | 38 |
| Tab. 25: Protokoll der Doppel-Immunfluoreszenz von CD81 und CD151 .....             | 38 |
| Tab. 26: Für Doppel-Immunfluoreszenz CD81/ 151 etablierte Substanzen .....          |    |
| und Konzentrationen.....  | 39 |
| Tab. 27: Mikroskopeinstellungen .....   | 40 |
| Tab. 28: Score Immunfluoreszenz-Signal Tetraspanine.....                            | 49 |
| Tab. 29: Kategorien zur Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbungen.....              | 51 |

|  |     |
|--|-----|
| Tab. 30: Haupt- und Unterkategorien zur Auswertung der Doppel-<br>Immunfluoreszenz-Färbungen .....   | 54  |
| Tab. 31: Score Doppel-Immunfluoreszenz .....   | 54  |
| Tab. 32: Score Entzündungsgrad.....  | 56  |
| Tab. 33: Getestete Varianten des Immunhistochemie-Protokolls für CD63.....   | 61  |
| Tab. 34: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Signale für CD63 in den<br>Grundkategorien für alle OA- und RA-Gewebe .....  | 68  |
| Tab. 35: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Signale für CD63 in den<br>Spezialkategorien für alle OA- und RA-Gewebe .....  | 69  |
| Tab. 36: Getestete Varianten des Immunhistochemie-Protokolls für CD81 .....  | 70  |
| Tab. 37: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Signale für CD81 in den<br>Grundkategorien für alle OA- und RA-Gewebe .....  | 76  |
| Tab. 38: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Signale für CD81 in den<br>Spezialkategorien für alle OA- und RA-Gewebe .....  | 77  |
| Tab. 39: Getestete Varianten des Immunhistochemie-Protokolls für CD151 .....   | 78  |
| Tab. 40: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Signale für CD151 in den<br>Grundkategorien für alle OA- und RA-Gewebe .....   | 85  |
| Tab. 41: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Signale für CD151 in<br>den Spezialkategorien für alle OA- und RA-Gewebe.....  | 86  |
| Tab. 42: Getestete Varianten des Immunhistochemie-Protokolls für CD9.....  | 88  |
| Tab. 43: Score-Werte der CD81- und CD151-Signale in der Doppel-<br>Immunfluoreszenz.....   | 96  |
| Tab. 44: Ergebnisse multipler Vergleichstests für schwach bzw. stark positiv<br>gefärbter Zellen im <i>sublining</i> der OA- bzw. RA-Gewebe für die<br>Tetraspanine CD63, CD81 und CD151 ..... | 100 |
| Tab. 45: Score-Mittelwerte der Immunfluoreszenz-Farbintensität zu CD63 von<br>Zellen im <i>sublining</i> für alle OA und RA.....   | 101 |
| Tab. 46: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Farbintensität zu CD81 von<br>Zellen im <i>sublining</i> für alle OA und RA.....   | 102 |
| Tab. 47: Score-Werte der Immunfluoreszenz-Farbintensität zu CD151 von<br>Zellen im <i>sublining</i> für alle OA und RA.....  | 103 |
| Tab. 48: Als signifikant berechnete Korrelationen zwischen<br>Immunfluoreszenz-Auswertungskategorien .....   | 104 |

## 11. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Herold G, Hrsg. Innere Medizin 2018: Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Gerd Herold; 2018
- 2 Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie e. V. Rheuma in Zahlen: Rheumatoide Arthritis
- 3 Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie e.V. Rheuma in Zahlen (31.12.2014). Im Internet: [dgrh.de/Start/DGRh/Presse/Daten-und-Fakten/Rheuma-in-Zahlen.html](http://dgrh.de/Start/DGRh/Presse/Daten-und-Fakten/Rheuma-in-Zahlen.html); Stand: 24.08.2020
- 4 Dunky A, Graninger W, Herold M, Smolen J, Wanivenhaus A. Praktische Rheumatologie. Fünfte, aktualisierte und erweiterte Auflage. Vienna: Springer Vienna; 2012
- 5 Welsch U, Deller T. Sobotta Lehrbuch Histologie: Unter Mitarbeit von Thomas Deller. 3. Aufl. s.l.: Urban Fischer Verlag - Lehrbücher; 2011
- 6 Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clinical Immunology*; DOI: 10.1016/j.clim.2004.12.009
- 7 Abeles AM, 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 (1-2): 20–24
- 8 Smith MD, Barg E, Weedon H et al. Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. *Ann Rheum Dis*; DOI: 10.1136/ard.62.4.303
- 9 Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*; DOI: 10.1111/j.0105-2896.2009.00859.x
- 10 Lefèvre S, Kneda A, Tennie C et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med*; DOI: 10.1038/nm.2050
- 11 Bustamante MF, Garcia-Carbonell R, Whisnant KD et al. Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*; DOI: 10.1186/s13075-017-1303-3
- 12 Szekanecz Z, Koch AE. Mechanisms of Disease: angiogenesis in inflammatory diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol*; DOI: 10.1038/ncprheum0647
- 13 Bühler M, Schmidt H. Lexikon Orthopädie und Unfallchirurgie: Pannus. Im Internet: [www.lexikon-orthopaedie.com/pdx.pl?dv=0&id=01189;01189](http://www.lexikon-orthopaedie.com/pdx.pl?dv=0&id=01189;01189); Stand: 25.08.2020
- 14 Ospelt C, Gay S, Klein K. Epigenetics in the pathogenesis of RA. *Semin Immunopathol*; DOI: 10.1007/s00281-017-0621-5
- 15 Karonitsch T. Rheumatoide Arthritis (RA). *Wien. Klin. Wochenschr. Educ*; DOI: 10.1007/s11812-016-0076-y
- 16 Aletaha D, Neogi T, Silman AJ et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*; DOI: 10.1136/ard.2010.138461

- 17 Fiehn C, Holle J, Iking-Konert C et al. S2e-Leitlinie: Therapie der rheumatoiden Arthritis mit krankheitsmodifizierenden Medikamenten. *Z Rheumatol*; DOI: 10.1007/s00393-018-0481-y
- 18 Guo Q, Wang Y, Xu D et al. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Res*; DOI: 10.1038/s41413-018-0016-9
- 19 Löffler G, Heinrich PC, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 8., völlig neu bearbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2007
- 20 Postigo AA, García-Vicuña R, Laffón A et al. The role of adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*; DOI: 10.3109/08916939309010649
- 21 Sarkissian M, Lafyatis R. Integrin engagement regulates proliferation and collagenase expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol* 1999; 162 (3): 1772–1779
- 22 Veale DJ, Maple C. Cell adhesion molecules in rheumatoid arthritis. *Drugs Aging*; DOI: 10.2165/00002512-199609020-00003
- 23 Lowin T, Straub RH. Integrins and their ligands in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*; DOI: 10.1186/ar3464
- 24 Kiener HP, Karonitsch T. The synovium as a privileged site in rheumatoid arthritis: cadherin-11 as a dominant player in synovial pathology. *Best Pract Res Clin Rheumatol*; DOI: 10.1016/j.berh.2011.11.012
- 25 Volin MV. Soluble adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des*; DOI: 10.2174/1381612053381972
- 26 Zimmermann-Geller B, Köppert S, Kesel N et al. Interactions between rheumatoid arthritis synovial fibroblast migration and endothelial cells. *Immunology and cell biology*; DOI: 10.1111/imcb.12208
- 27 Florin L, Lang T. Tetraspanin Assemblies in Virus Infection. *Front Immunol*; DOI: 10.3389/fimmu.2018.01140
- 28 Schaper F, van Spriel AB. Antitumor Immunity Is Controlled by Tetraspanin Proteins. *Front Immunol*; DOI: 10.3389/fimmu.2018.01185
- 29 Neumann E, Schwarz MC, Hasseli R et al. Tetraspanin CD82 affects migration, attachment and invasion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis*; DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-212954
- 30 Kummer D, Steinbacher T, Schwietzer MF et al. Tetraspanins: integrating cell surface receptors to functional microdomains in homeostasis and disease. *Med Microbiol Immunol*; DOI: 10.1007/s00430-020-00673-3
- 31 Ramachandran RP, Vences-Catalán F, Wiseman D et al. EspH Suppresses Erk by Spatial Segregation from CD81 Tetraspanin Microdomains. *Infect Immun*; DOI: 10.1128/IAI.00303-18
- 32 Korkusuz P, Dagdeviren A, Eksioğlu F et al. Immunohistological analysis of normal and osteoarthritic human synovial tissue. *Bull Hosp Jt Dis* 2005; 63 (1-2): 63–69
- 33 Berditchevski F. Complexes of tetraspanins with integrins

- 34 Seubert B, Cui H, Simonavicius N et al. Tetraspanin CD63 acts as a pro-metastatic factor via  $\beta$ -catenin stabilization. *Int J Cancer*; DOI: 10.1002/ijc.29296
- 35 Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*; DOI: 10.1038/nrm1736
- 36 Yang Y-G, Sari IN, Zia MF et al. Tetraspanins: Spanning from solid tumors to hematologic malignancies. *Exp Hematol*; DOI: 10.1016/j.exphem.2016.02.006
- 37 Levy S. Function of the tetraspanin molecule CD81 in B and T cells. *Immunol Res*; DOI: 10.1007/s12026-014-8490-7
- 38 Florin L, Winde CM de. Recent advancements in the understanding of tetraspanin functions. *Med Microbiol Immunol*; DOI: 10.1007/s00430-020-00687-x
- 39 Jankovičová J, Neuerová Z, Sečová P et al. Correction to: Tetraspanins in mammalian reproduction: spermatozoa, oocytes and embryos. *Med Microbiol Immunol*; DOI: 10.1007/s00430-020-00686-y
- 40 Berditchevski F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 2001; 114 (Pt 23): 4143–4151
- 41 Jiang X, Zhang J, Huang Y. Tetraspanins in cell migration. *Cell Adh Migr*; DOI: 10.1080/19336918.2015.1005465
- 42 Termini CM, Gillette JM. Tetraspanins Function as Regulators of Cellular Signaling. *Front Cell Dev Biol*; DOI: 10.3389/fcell.2017.00034
- 43 Hong I-K, Byun H-J, Lee J et al. The tetraspanin CD81 protein increases melanoma cell motility by up-regulating metalloproteinase MT1-MMP expression through the pro-oncogenic Akt-dependent Sp1 activation signaling pathways. *J Biol Chem*; DOI: 10.1074/jbc.M113.534206
- 44 Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci*; DOI: 10.1007/PL00000933
- 45 Takamori S, Holt M, Stenius K et al. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*; DOI: 10.1016/j.cell.2006.10.030
- 46 Sowers AE, Hackenbrock CR. Rate of lateral diffusion of intramembrane particles: measurement by electrophoretic displacement and rerandomization. *Proc Natl Acad Sci U S A*; DOI: 10.1073/pnas.78.10.6246
- 47 Nydegger S, Khurana S, Kremmentsov DN et al. Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J Cell Biol*; DOI: 10.1083/jcb.200508165
- 48 Reyes R, Cardeñes B, Machado-Pineda Y et al. Tetraspanin CD9: A Key Regulator of Cell Adhesion in the Immune System. *Front Immunol*; DOI: 10.3389/fimmu.2018.00863
- 49 Mathieu M, Névo N, Jouve M et al. Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nat Commun*; DOI: 10.1038/s41467-021-24384-2
- 50 Jankovičová J, Simon M, Antalíková J et al. Role of tetraspanin CD9 molecule in fertilization of mammals. *Physiological research*; DOI: 10.33549/physiolres.932876

- 51 Frolikova M, Manaskova-Postlerova P, Cerny J et al. CD9 and CD81 Interactions and Their Structural Modelling in Sperm Prior to Fertilization. *Int J Mol Sci*; DOI: 10.3390/ijms19041236
- 52 Murayama Y, Oritani K, Tsutsui S. Novel CD9-targeted therapies in gastric cancer. *World J Gastroenterol*; DOI: 10.3748/wjg.v21.i11.3206
- 53 Boucheix C, Benoit P. CD9 antigen: will platelet physiology help to explain the function of a surface molecule during hemopoietic differentiation? *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30 (4): 201–202
- 54 Kaji K, Takeshita S, Miyake K et al. Functional association of CD9 with the Fc gamma receptors in macrophages. *J Immunol*; DOI: 10.4049/jimmunol.166.5.3256
- 55 Liu J, Zhu G, Jia N et al. CD9 regulates keratinocyte migration by negatively modulating the sheddase activity of ADAM17. *Int J Biol Sci*; DOI: 10.7150/ijbs.29404
- 56 Miyake M, Koyama M, Seno M et al. Identification of the motility-related protein (MRP-1), recognized by monoclonal antibody M31-15, which inhibits cell motility. *J Exp Med*; DOI: 10.1084/jem.174.6.1347
- 57 Brosseau C, Colas L, Magnan A et al. CD9 Tetraspanin: A New Pathway for the Regulation of Inflammation? *Front Immunol*; DOI: 10.3389/fimmu.2018.02316
- 58 Sumiyoshi N, Ishitobi H, Miyaki S et al. The role of tetraspanin CD9 in osteoarthritis using three different mouse models. *Biomedical research (Tokyo, Japan)*; DOI: 10.2220/biomedres.37.283
- 59 Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res*; DOI: 10.1016/j.yexcr.2008.09.020
- 60 Aaberg-Jessen C, Sørensen MD, Matos ALSA et al. Co-expression of TIMP-1 and its cell surface binding partner CD63 in glioblastomas. *BMC Cancer*; DOI: 10.1186/s12885-018-4179-y
- 61 Vicencio JM, Yellon DM, Sivaraman V et al. Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*; DOI: 10.1016/j.jacc.2015.02.026
- 62 Jung K-K, Liu X-W, Chirco R et al. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J*; DOI: 10.1038/sj.emboj.7601281
- 63 Liu W-H, Li X, Zhu X-L et al. CD63 inhibits the cell migration and invasion ability of tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*; DOI: 10.3892/ol.2018.8499
- 64 Kubo Y, Masumoto H, Izumida M et al. Rab3a-Bound CD63 Is Degraded and Rab3a-Free CD63 Is Incorporated into HIV-1 Particles. *Front Microbiol*; DOI: 10.3389/fmicb.2017.01653
- 65 Ridnour LA, Barasch KM, Windhausen AN et al. Nitric oxide synthase and breast cancer: role of TIMP-1 in NO-mediated Akt activation. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0044081

- 66 Khushman M, Bhardwaj A, Patel GK et al. Exosomal Markers (CD63 and CD9) Expression Pattern Using Immunohistochemistry in Resected Malignant and Nonmalignant Pancreatic Specimens. *Pancreas*; DOI: 10.1097/MPA.0000000000000847
- 67 Logozzi M, Milito A de, Lugini L et al. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0005219
- 68 Miki Y, Yashiro M, Okuno T et al. Clinico-pathological significance of exosome marker CD63 expression on cancer cells and stromal cells in gastric cancer. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0202956
- 69 Lewitowicz P, Matykiewicz J, Koziel D et al. CD63 and GLUT-1 Overexpression Could Predict a Poor Clinical Outcome in GIST: A Study of 54 Cases with Follow-Up. *Gastroenterol Res Pract*; DOI: 10.1155/2016/6478374
- 70 Koh H, An H, Jung J et al. The prognostic significance of CD63 expression in patients with non-small cell lung cancer. *Pol J Pathol*; DOI: 10.5114/pjp.2019.90394
- 71 Lopez S, Halbwachs-Mecarelli L, Ravaut P et al. Neutrophil expression of tumour necrosis factor receptors (TNF-R) and of activation markers (CD11b, CD43, CD63) in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*; DOI: 10.1111/j.1365-2249.1995.tb02272.x
- 72 Justo BL, Jasiulionis MG. Characteristics of TIMP1, CD63, and  $\beta$ 1-Integrin and the Functional Impact of Their Interaction in Cancer. *Int J Mol Sci*; DOI: 10.3390/ijms22179319
- 73 Kumari S, Devi G, Badana A et al. CD151-A Striking Marker for Cancer Therapy. *Biomark Cancer*; DOI: 10.4137/BIC.S21847
- 74 Carloni V, Mazzocca A, Ravichandran KS. Tetraspanin CD81 is linked to ERK/MAPKinase signaling by Shc in liver tumor cells. *Oncogene*; DOI: 10.1038/sj.onc.1207287
- 75 Küppers R. CD81 as target for B cell lymphomas. *J Exp Med*; DOI: 10.1084/jem.20190733
- 76 Ding H, Dai Y, Lei Y et al. Upregulation of CD81 in trophoblasts induces an imbalance of Treg/Th17 cells by promoting IL-6 expression in preeclampsia. *Cell Mol Immunol*; DOI: 10.1038/s41423-018-0186-9
- 77 Chen F, Hu Y, Wang X et al. Expression of CD81 and CD117 in plasma cell myeloma and the relationship to prognosis. *Cancer Med*; DOI: 10.1002/cam4.1840
- 78 Hosokawa K, Ishimaru H, Watanabe T et al. The Lysosome Pathway Degrades CD81 on the Cell Surface by Poly-ubiquitination and Clathrin-Mediated Endocytosis. *Biol Pharm Bull*; DOI: 10.1248/bpb.b19-01097
- 79 Zhang N, Zuo L, Zheng H et al. Increased Expression of CD81 in Breast Cancer Tissue is Associated with Reduced Patient Prognosis and Increased Cell Migration and Proliferation in MDA-MB-231 and MDA-MB-435S Human Breast Cancer Cell Lines In Vitro. *Med Sci Monit*; DOI: 10.12659/MSM.911612
- 80 Inoue G, Horiike N, Onji M. The CD81 expression in liver in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med*; DOI: 10.3892/ijmm.7.1.67

- 81 Zeng P, Wang Y-H, Si M et al. Tetraspanin CD151 as an emerging potential poor prognostic factor across solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*; DOI: 10.18632/oncotarget.13532
- 82 Wong AH, Tran T. CD151 in Respiratory Diseases. *Front Cell Dev Biol*; DOI: 10.3389/fcell.2020.00064
- 83 Shigeta M, Sanzen N, Ozawa M et al. CD151 regulates epithelial cell-cell adhesion through PKC- and Cdc42-dependent actin cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol*; DOI: 10.1083/jcb.200301075
- 84 Zhao K, Wang Z, Hackert T et al. Tspan8 and Tspan8/CD151 knockout mice unravel the contribution of tumor and host exosomes to tumor progression. *J Exp Clin Cancer Res*; DOI: 10.1186/s13046-018-0961-6
- 85 Sadej R, Lu X, Turczyk L et al. CD151 regulates expression of FGFR2 in breast cancer cells via PKC-dependent pathways. *J Cell Sci*; DOI: 10.1242/jcs.220640
- 86 Lin W, Liu J, Chen J et al. Peptides of tetraspanin oncoprotein CD151 trigger active immunity against primary tumour and experimental lung metastasis. *EBioMedicine*; DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.10.025
- 87 Yang Y-M, Zhang Z-W, Liu Q-M et al. Overexpression of CD151 predicts prognosis in patients with resected gastric cancer. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0058990
- 88 Romanska HM, Potemski P, Collins SI et al. Loss of CD151/Tspan24 from the complex with integrin  $\alpha 3\beta 1$  in invasive front of the tumour is a negative predictor of disease-free survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*; DOI: 10.1016/j.oraloncology.2012.09.013
- 89 Tokuhara T, Hasegawa H, Hattori N et al. Clinical significance of CD151 gene expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7 (12): 4109–4114
- 90 Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T et al. Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer. *Br J Cancer*; DOI: 10.1038/sj.bjc.6601015
- 91 Suzuki S, Miyazaki T, Tanaka N et al. Prognostic significance of CD151 expression in esophageal squamous cell carcinoma with aggressive cell proliferation and invasiveness. *Ann Surg Oncol*; DOI: 10.1245/s10434-010-1387-3
- 92 Zhu G-H, Huang C, Qiu Z-J et al. Expression and prognostic significance of CD151, c-Met, and integrin  $\alpha 3/\alpha 6$  in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig Dis Sci*; DOI: 10.1007/s10620-010-1416-x
- 93 Liu L-X, Lu J-C, Zeng H-Y et al. Mortalin stabilizes CD151-dependent tetraspanin-enriched microdomains and implicates in the progression of hepatocellular carcinoma. *J Cancer*; DOI: 10.7150/jca.36301
- 94 Medrano M, Communal L, Brown KR et al. Interrogation of Functional Cell-Surface Markers Identifies CD151 Dependency in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cell Rep*; DOI: 10.1016/j.celrep.2017.02.028
- 95 Voss MA, Gordon N, Maloney S et al. Tetraspanin CD151 is a novel prognostic marker in poor outcome endometrial cancer. *Br J Cancer*; DOI: 10.1038/bjc.2011.80

- 96 Hwang S, Takimoto T, Hemler ME. Integrin-independent support of cancer drug resistance by tetraspanin CD151. *Cell Mol Life Sci*; DOI: 10.1007/s00018-019-03014-7
- 97 Zhao S-J, Zhao H-D, Li J et al. CD151 promotes breast cancer metastasis by activating TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*; DOI: 10.26355/eurrev\_201811\_16268
- 98 Fujita Y, Shiomi T, Yanagimoto S et al. Tetraspanin CD151 is expressed in osteoarthritic cartilage and is involved in pericellular activation of pro-matrix metalloproteinase 7 in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum*; DOI: 10.1002/art.22140
- 99 Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014
- 100 Lang G. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Zweite, überarbeitete und aktualisierte Auflage. Vienna: Springer Vienna; 2013
- 101 Noll S, Schaub-Kuhnen S, Hrsg. *Praxis der Immunhistochemie*. 1. Aufl. München, Jena: Urban & Fischer; 2000
- 102 Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011
- 103 Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016
- 104 Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013
- 105 Gressner AM, Arndt T, Hrsg. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019
- 106 Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn*; DOI: 10.2353/jmoldx.2010.090188
- 107 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods*; DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- 108 García-Vicuña R, Gómez-Gaviro MV, Domínguez-Luis MJ et al. CC and CXC chemokine receptors mediate migration, proliferation, and matrix metalloproteinase production by fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*; DOI: 10.1002/art.20615
- 109 Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*; DOI: 10.1038/nrc1098
- 110 Langley RR, Fidler IJ. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev*; DOI: 10.1210/er.2006-0027
- 111 Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*; DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60826-4

- 112 Carmo LAS, Bonjour K, Ueki S et al. CD63 is tightly associated with intracellular, secretory events chaperoning piecemeal degranulation and compound exocytosis in human eosinophils. *J Leukoc Biol*; DOI: 10.1189/jlb.3A1015-480R
- 113 *Schmidt RF, Lang F, Heckmann M*, Hrsg. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie : mit herausnehmbaren Repetitorium*. 31., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Heidelberg: Springer Medizin-Verlag; 2010
- 114 Pfistershammer K, Majdic O, Stöckl J et al. CD63 as an activation-linked T cell costimulatory element. *J Immunol*; DOI: 10.4049/jimmunol.173.10.6000
- 115 Tavasolian F, Moghaddam AS, Rohani F et al. Exosomes: Effectual players in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*; DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102511
- 116 Miyazawa K, Mori A, Yamamoto K et al. Transcriptional Roles of CCAAT/Enhancer Binding Protein- $\beta$ , Nuclear Factor- $\kappa$ B, and C-promoter Binding Factor 1 in Interleukin (IL)-1 $\beta$ -induced IL-6 Synthesis by Human Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes. *Journal of Biological Chemistry*; DOI: 10.1074/jbc.273.13.7620
- 117 Miyazawa K, Mori A, Miyata H et al. Regulation of interleukin-1 $\beta$ -induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*; DOI: 10.1074/jbc.273.38.24832

## 12. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

### Erklärung zur Dissertation

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

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

### **13. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich allen von ganzem Herzen danken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt dabei meiner Doktormutter Frau PD Dr. Elena Neumann. Vielen Dank für die großartige Betreuung, die man sich nicht hätte besser vorstellen können, für die Begutachtung, die wertvolle Hilfe bei sämtlichen Problemen, die freundliche und motivierende Unterstützung und den großen Zeitaufwand. Von Anfang bis Ende habe ich mich immer gut aufgehoben gefühlt.

Ein großer Dank geht auch an meine beiden Betreuerinnen Carina Schreyäck und Mona Arnold für die Einführung in die Laborarbeit, ohne die ich verloren gewesen wäre, für die durchgeführten Vorarbeiten zu meiner Doktorarbeit und die liebe Unterstützung zu jeder Zeit und bei allen Fragen.

Herrn Prof. Dr. Ulf Müller-Ladner möchte ich insbesondere danken für die vielen hilfreichen Anmerkungen und die konstruktive Kritik.

Frau PD Dr. Undraga Schagdarsurengin vom Biomedizinischen Forschungszentrum Seltersberg in Gießen möchte ich für die Kooperation sowie die Bereitstellung eines CD81-Antikörpers danken.

Zudem möchte ich mich bei dem Team des Franz-Groedel-Instituts bedanken. Es war eine schöne Zeit mit einem sehr netten und hilfsbereiten Team.

Weiterhin möchte ich dem Verein der Freunde und Förderer der Kerckhoff-Klinik e.V. für die finanzielle Unterstützung meiner Forschung danken.

Ein spezieller Dank gilt meinen lieben WG-Mitbewohnern, Valentina und Jasmin, die unsere WG in ein Zuhause verwandelt haben. Danke für die wundervolle, lustige Zeit und für die Freundschaft, die hoffentlich noch sehr lange besteht.

Abschließend gilt ein ganz besonderer Dank meiner Familie, denn ohne sie hätte ich diesen Lebensweg in vielerlei Hinsicht nicht absolvieren können. Besonders meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mich unter allen Bedingungen und in jeder Lebenslage unterstützen. Ein großer Dank geht auch an meinen Lieblingsbruder, der nicht nur der allerbeste Bruder der Welt, sondern auch mein bester Freund ist. Weiterhin möchte ich meinen Großeltern danken für die Begeisterung, mit der sie immer mitfieberten und jeden meiner Schritte verfolgten. Ich wünschte, sie alle könnten auch die weiteren miterleben. Ein besonderes Dankeschön gilt meinem Freund Lukas für das Gesamtpaket, dafür, dass er immer für mich da ist und für das Versprechen, zusammen durch Dick und Dünn zu gehen.