

**Der Einfluss von Adipokinen auf das Adhäsionsverhalten
synovialer Fibroblasten von Patienten mit
rheumatoider Arthritis**



Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.)
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Rebecca Hasseli
aus Horb am Neckar

Gießen, 2018

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin mit dem Schwerpunkt Rheumatologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Ulf Müller-Ladner

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

Gutachter: Priv. Doz. Dr. med. Jens Kordelle

Tag der Disputation: 23. Juli 2018

Für meine Familie und Freunde

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

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Ein Überblick über die Geschichte der Rheumatologie.....	1
1.2 Die rheumatoide Arthritis.....	1
1.3 Diagnostik der rheumatoiden Arthritis.....	3
1.3 ACR/EULAR Klassifikation (<i>Scoring-System</i>).....	5
1.4 Therapie.....	5
1.4.1 Nichtsteroidale Antirheumatika.....	5
1.4.2 Glukokortikoide	6
1.4.3 Weitere Therapeutika der RA.....	7
1.5 Gelenkveränderungen im Rahmen der RA.....	9
1.6 Synoviale Fibroblasten (SF)	10
1.7 Die Migrationsfähigkeit der RASF.....	11
1.8 Adhäsionsmoleküle und die Rolle des vaskulären Systems	12
1.8.1 P-Selectin und E-Selectin	14
1.8.2 VCAM-1 und ICAM-1	15
1.8.3 Integrine.....	15
1.8.4 Cadherin-11	16
1.8.5 CD44	18
1.9 Die Rolle des weißen Fettgewebes bei entzündlichen Prozessen	19
1.9.1 Allgemeiner Überblick	19
1.9.2 Adiponektin.....	20
1.9.3 Visfatin.....	21
1.9.4 Resistin.....	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien, Materialien und Enzyme	23
2.1.2 Verwendete Medien	24
2.1.3 Verwendete Lösungen	24
2.1.4 Verwendete Oligonukleotide (Primer).....	24
2.1.5 Verwendete Kits.....	25
2.1.6 Geräte.....	25
2.1.7 Verwendete Zellen	26
2.1.8 Stimulanzen	26
2.2 Methoden	26
2.2.1 Isolierung humaner synovialer Fibroblasten.....	26
2.2.2 Kultivierung der RASF mit DMEM und RPMI 1640.....	27
2.2.3 Einfrieren und Auftauen von RASF	27
2.2.4 Isolierung von humanen Endothelzellen.....	28
2.2.5 Kultivierung der Endothelzellen.....	29

2.2.6	Stimulierung von Fibroblasten bzw. Endothelzellen	29
2.2.7	RNA-Isolierung	30
2.2.8	Nachweis der Genexpression	30
2.2.9	Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.10	Real-time PCR.....	32
2.2.11	Optimierung der Primer für die Real-time PCR	33
2.2.12	Statischer Adhäsionsassay (Zell-Zell-Bindungsassay)	34
2.2.13	Dynamischer Adhäsionsassay (Flusskammerversuch)	35
2.3	Statistik	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Expression der Adhäsionsmoleküle nach Stimulierung der RASF	38
3.1.1	CD44	38
3.1.2	Integrin $\alpha 2$	39
3.1.3	Integrin $\alpha 4$	40
3.1.4	Integrin αv	41
3.1.5	Integrin $\beta 1$	42
3.1.6	Integrin $\beta 5$	43
3.1.7	Cadherin-11	44
3.1.8	VCAM-1	45
3.1.9	ICAM-1	46
3.2	Expression der Adhäsionsmoleküle nach Stimulierung der EC	47
3.2.1	VCAM-1	47
3.2.2	ICAM-1	48
3.2.3	P-Selectin	49
3.3	Interaktion der RASF und EC im statischen Adhäsionsassay	50
3.4	Interaktion der RASF mit E-Selectin im dynamischen Adhäsionsassay ..	51
3.5	Interaktion der RASF und EC im dynamischen Adhäsionsassay	54
4	Diskussion	57
4.1	Expressionsanalyse der Adhäsionsmoleküle.....	58
4.1.1	P-Selectin, E-Selectin und CD44 im Rahmen des „Rollens“	58
4.1.2	Die Interaktion zwischen VCAM-1, ICAM-1 und Integrinen	61
4.1.3	Die Adhäsion der Integrine an die EZM.....	64
4.1.4	Bildung der Intima-Schicht des Synoviums durch Cadherin-11	67
4.1.5	Interaktion von RASF mit Leukozyten	68
4.2	Das Adhäsionsverhalten der RASF im Zell-Zell-Versuch.....	70
4.3	Das Adhäsionsverhalten der RASF unter Flussbedingungen	72
4.4	Einfluss des Fettgewebes auf die RA und therapeutische Konsequenz.....	75
5	Zusammenfassung	77
Summary	79
6	Literaturverzeichnis	80
7	Liste der zitierbaren Abstracts	95
8	Vorträge und Posterpräsentationen	96

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Gelenkaufbaus	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Gelenkdestruktion	10
Abbildung 3: Die Migration der Leukozyten	12
Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau des Flussversuches	37
Abbildung 5: mRNA-Expression des Adhäsionsmoleküls CD44 (n=1) in RASF	38
Abbildung 6: mRNA-Expression des Adhäsionsmoleküls Integrin $\alpha 2$ in RASF	39
Abbildung 7: Expression des Adhäsionsmoleküls Integrin $\alpha 4$ in RASF	40
Abbildung 8: Expression des Adhäsionsmoleküls Integrin αv in RASF	41
Abbildung 9: Expression des Adhäsionsmoleküls Integrin $\beta 1$ in RASF	42
Abbildung 10: Expression des Adhäsionsmoleküls Integrin $\beta 5$ in RASF	43
Abbildung 11: Expression des Adhäsionsmoleküls Cadherin-11 in RASF	44
Abbildung 12: Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 in RASF	45
Abbildung 13: Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in RASF	46
Abbildung 14: Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 in EC	47
Abbildung 15: Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in EC	48
Abbildung 16: Expression des Adhäsionsmoleküls P-Selectin in EC	49
Abbildung 17: EC und RASF	50
Abbildung 18: Zell-Zell-Bindungsassay	51
Abbildung 19: Flusskammerversuch (E-Sel-Beschichtung) bei unstimulierten RASF .	52
Abbildung 20: Flusskammerversuch (E-Sel-Beschichtung) bei stimulierten RASF	53
Abbildung 21: Flusskammerversuch (HUVEC) bei unstimulierten RASF	54
Abbildung 22: Flusskammerversuch (HUVEC) mit Adipokine	55
Abbildung 23: Flusskammerversuch (HUVEC) mit Therapeutika	56
Abbildung 24: Schematische Darstellung des „Rollens“ der RASF	59
Abbildung 25: Interaktion von VCAM-1 und Integrinen	62
Abbildung 26: Vereinfachte Darstellung der EZM-Bindung der Integrine	66
Abbildung 27: Cadherin-11 bedingte Bindung von RASF	68
Abbildung 28: Zell-Zell-Bindung der RASF mit Leukozyten	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die aktuell eingesetzten DMARDs in Deutschland.....	8
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien, Materialien und Enzyme	23
Tabelle 3: Verwendete Medien	24
Tabelle 4: Verwendete Lösungen	24
Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide (Primer).....	25
Tabelle 6: Kits	25
Tabelle 7: Geräte.....	25
Tabelle 8: Verwendete Zellen	26
Tabelle 9: Adipokine	26
Tabelle 10: RA-Therapeutika.....	26

Abkürzungsverzeichnis

ACPA	Antikörper gegen citrullinierte Peptide/Proteine
ACR	American College of Rheumatology
AdipoR	Adiponektin-Rezeptor
ADSF	<i>Adipocyte-secreted factor</i>
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CAM	<i>Cell adhesion molecule</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CMC	Carpometocarpal-Gelenk
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
DIP	Distales Interphalangealgelenk
DGRh	Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie
DMARD	<i>Disease-modifying antirheumatic drug</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelzellen
ECGS	<i>Endothelial cell growing supplement</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-SEL	E-Selectin
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FIZZ3	<i>Found in inflammatory zone 3</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MCP	Metacarpophalangealgelenke
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MTP	Metatarsophalangealgelenk
MTX	Methotrexat
MTX (C)	Methotrexatkonzentration im Rahmen einer Tumor-Therapie (C = Cancer)
MTX (RA)	Methotrexatkonzentration im Rahmen einer RA-Therapie
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (without Ca and Mg)</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIP	Proximales Interphalangealgelenk
PPI	Protonenpumpeninhibitor
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	<i>Receptor activator of NF-κB</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)</i>
RT	Raumtemperatur
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SF	Synoviale Fibroblasten
TNF-α	Tumornekrose-Faktor α
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

1 Einleitung

1.1 Ein Überblick über die Geschichte der Rheumatologie

Der Begriff „Rheuma“ stammt ursprünglich aus dem Altgriechischen und bedeutet Strömung/Fluss. Hippokrates (460-377 v. Chr.) hatte die Vorstellung, dass die vier Körpersäfte (Blut, Schleim, gelbe und schwarze Galle) eine wichtige Rolle beim Krankheitsgeschehen spielen. Dabei wurde Phlegma, einem dieser Körpersäfte, eine besondere Rolle zugesprochen. Diese Theorie besagte, dass das Phlegma, als eher kalter Körpersaft, vom Gehirn herabfließe und verschiedene Gelenke befall. Je nach Lokalisation führe der Befall zur „Podagra“ (Fußbefall), „Gonagra“ (Kniebefall) oder „Cheiragra“ (Handbefall) und verursache somit eine Erkrankung der Gelenke. Hippokrates hatte hierbei ein humoralpathologisches Bild der Rheuma-Erkrankung. Diese Vorstellung hielt bis in die Renaissance an. Der Pariser Arzt Guillaume de Baillou (1558-1616) prägte den Begriff „Rheumatismus“ durch die Beobachtung der Krankheitserscheinung und Auswirkung der Erkrankung. Dieser Begriff schloss alle Krankheitserscheinungen mit ein, die durch die „herumziehenden“ Schmerzen im muskuloskelettalen System entstanden. Seine Erkenntnisse veröffentlichte er 1642 mit dem Titel „Liber de Rheumatismo et Pleuritide Dorsali“. Die nächsten Entdeckungen in der Rheumatologie blieben zunächst in französischer Hand. Jean-Baptiste Boulliaud beschrieb 1835 in seinem Werk „Traité clinique des maladies du coeur“ einen Zusammenhang zwischen der Mitralklappeninsuffizienz und dem Gelenkrheumatismus. Er beobachtete dies hauptsächlich bei fiebernden, meist jungen Personen. Bereits 1876 verwendete Sir A.B. Garrod in seinem Werk „Treatise on Gout“ den Begriff „Rheumatoid Arthritis“. Sein Sohn A. E. Garrod differenzierte sogar schon zwischen einer primären und einer sekundären Arthritis. 1913 beschrieb Friedrich von Müller den Unterschied zwischen einer Arthritis und einer Arthrose und prägte dadurch die Pathophysiologie. Langsam formte sich eine Definition der rheumatischen Krankheitsbilder.

Obwohl vor allem die letzten Jahrzehnte zahlreiche neue Erkenntnisse über die rheumatologischen Erkrankungen und eine mögliche Genese brachten, sind dennoch deren genaue Ursachen bis heute nicht vollständig bekannt (Rheumastiftung 2015; Dunky 2012).

1.2 Die rheumatoide Arthritis

Inzwischen ist gesichert, dass die rheumatoide Arthritis (RA) zu den chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen gehört. Schätzungsweise leidet ca. 1% der Weltbevölkerung an einer RA, mit einem höheren Krankheitsauftreten bei Frauen (Dunky 2012). Hauptsächlich kommt es zu einem Befall der Gelenke, geprägt durch eine Synovitis mit

Destruktion des Knorpels und des Knochens. Die RA kann sich in jedem Alter manifestieren, die Prävalenz steigt jedoch im höheren Lebensalter an (Dunky 2012). Infektionen als mögliche Ursache wurden lange diskutiert. Dies konnte jedoch nicht belegt werden. Trotzdem kann eine infektiöse Genese nicht ausgeschlossen werden. Auch der Tabakkonsum wird als möglicher Risikofaktor in Betracht gezogen. Eine Assoziation mit bestimmten Gensequenzen, wie z.B. HLA-DRB1*0401, *0404, *0408 und *0101/2 konnte nachgewiesen werden. Darüber hinaus wiesen Patienten mit diesen Gensequenzen meist einen schwereren Verlauf der RA auf (Dunky 2012). Diese Allele spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Lymphozyten, wodurch besonders initial der Ausbruch der RA getriggert werden könnte. Bei der RA beginnt zunächst die Intimazellschicht des Synoviums zu proliferieren und es bildet sich eine villöse Hyperplasie (McInnes und Schett 2011). Dies führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion. Verschiedene Zellen des Immunsystems wandern in das Synovium ein. Die Endothelzellen (EC) in den Gefäßen des Synoviums werden aktiviert, so dass nachfolgend verschiedene Adhäsionsmoleküle hochreguliert werden und die Adhäsion der einwanderten Immunzellen ermöglichen (McInnes und Schett 2011). Dabei kommt es zur Interaktion, unter anderem auch bereits im Lymphknoten, zwischen den aktivierten T-Lymphozyten und den B-Lymphozyten, welche Immunglobuline produzieren. Diese Immunglobuline können gegen körpereigene Strukturen gerichtet sein (Autoantikörper). Sie werden unter dem Begriff Rheumafaktoren zusammengefasst und sie sind serologisch nachweisbar. Nicht jeder Patient weist Rheumafaktoren auf. Zusätzlich produzieren gewebständige, sowie einwandernde Makrophagen unterschiedliche entzündungssteigernde Zytokine, unter anderem Interleukin-1 (IL-1), IL-6 und Tumornekrosefaktor α (TNF- α). Die Entzündungsreaktion führt zur Hyperplasie und lokal zu hypoxischen Bedingungen. Verschiedene Zytokine werden dabei sezerniert, wie z.B. HIF-1 und VEGF, was dann wiederum zu einer Hypervaskularisation führt (McInnes und Schett 2011; Szekanecz et al. 2009). Dadurch kommt es zur Invasion weiterer Immunzellen und es findet ein sich selbst verstärkender Entzündungsprozess statt. Zusätzlich wird die Proliferation von synovialen Fibroblasten angeregt, die ebenfalls zum proentzündlichen und proangiogenen Milieu im betroffenen Gelenk beitragen. Es entsteht ein invasiv-destruktives Gewebe (Pannus), welches Knorpel und Knochen abbaut. Lange wurde bei diesen Vorgängen die destruiende Rolle der Fibroblasten vernachlässigt. Lefèvre et al.(2009) konnten nachweisen, dass auch die Fibroblasten an der Destruktion aktiv beteiligt sind und dabei sogar ein ähnliches Migrationsverhalten wie Leukozyten aufweisen können.

Der klinische Gelenkbefall zeigt ein variables Bild. Zusätzlich zu den Gelenken können viszerale Organe betroffen sein. Oft zeigt sich zu Beginn der Erkrankung eine ausgeprägte Morgensteifigkeit (>45 min) und bei einer Polyarthrititis ein symmetrischer Befall

kleinerer Gelenke, wie z.B. Hand- und Fußgelenke. Es kommt häufig zu einem schleichend progredienten Verlauf, ein akuter Krankheitsverlauf ist aber auch möglich. In der Regel stellen sich die Patienten mit Bewegungseinschränkung und Arthralgien ärztlich vor. Diese Symptome entstehen durch die entzündlichen Vorgänge und die Schwellungen im Rahmen der Synovitis, welche zur Einschränkung der Beweglichkeit führen. Die Vorgänge sind jedoch reversibel. Im späteren Stadium kann es zusätzlich durch Fehlstellungen und pathologische Veränderungen des Gelenks, Atrophien der Muskulatur und Tendopathien zur Bewegungseinschränkung kommen. Dies kann sich z.B. in Form einer Ulnardeviation, Schwanenhalsdeformität oder Knopflochdeformität der Phalangen zeigen. Im Verlauf der Erkrankung treten Krankheitsschübe auf. Eine Remission ohne Therapie tritt selten ein. Bei einer Oligoarthritis (<5 Gelenke) sind zu 50% die Kniegelenke, zu 30% Schulter- und Hüftgelenke und zu 20% die Sprung- und Ellenbogengelenke betroffen.

Die Systemerkrankung führt zudem zu einer unspezifischen Symptomatik. Dazu gehören allgemeines Krankheitsgefühl, Fieber, Müdigkeit und Appetitlosigkeit. Eine extraartikuläre Manifestation ist häufig bei einem aggressiven Verlauf mit starker Destruktion der Gelenke vorzufinden. Oft ist eine extraartikuläre Manifestation mit positivem Rheumafaktor, Auftreten von Rheumaknoten und HLA DRB1*0401 assoziiert. Die Rheumaknoten sind häufig im Verlauf der Sehnenscheiden zu finden. Ein Auftreten in Organen ist jedoch auch möglich. Histologisch sind die Rheumaknoten durch zentrale fibrinoide Nekrosen, palisadenartigen Zellsaum und umgebendes Granulationsgewebe charakterisiert (Dunky 2012; Rheumastiftung 2015).

1.3 Diagnostik der rheumatoiden Arthritis

Die Diagnose einer RA wird abhängig vom klinischen Bild, der Laborparameter und der Bildgebung gestellt. Bei der RA handelt es sich um eine Erkrankung mit systemischer Entzündung (Dunky 2012). Dabei ist eine Erhöhung der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) zu beobachten. Die einzelnen Sedimente im Blut setzen sich schneller ab. Dieser Wert ist unter anderem abhängig von der Zusammensetzung des Blutes und kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden (Dunky 2012).

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein Akutphase-Protein, welches von der Leber synthetisiert wird. Der CRP-Serumspiegel ist im Rahmen verschiedener entzündlicher Prozesse erhöht. In der RA spiegelt dieser Wert, wie auch die BSG, die Aktivität der RA gut wider (Dunky 2012).

Zusätzlich kann es zu einer Thrombozytose und einer normochromen Anämie kommen. Die Ursachen für die Anämie sind vielfältig. Sie kann aber unter anderem (u.a.) durch

den Eisenmangel entstehen, der durch die chronische Entzündung hervorgerufen wird. Derartige Anämien werden unter dem Begriff „Anemia of Chronic Disease“ zusammengefasst (Dunky 2012).

Bei etwa zwei Drittel der Patienten sind bei einem längeren Krankheitsverlauf Rheumafaktoren (RF) nachweisbar. Hauptsächlich handelt es sich dabei um Autoantikörper, meist aus der IgM-Klasse, gegen den Fc-Teil des humanen IgG. Es konnten aber auch Autoantikörper der Klasse IgG und IgA nachgewiesen werden. Die Rheumafaktoren werden zu diagnostischen Zwecken nachgewiesen, dienen jedoch nicht zur Verlaufskontrolle (Dunky 2012).

Patienten mit einem schweren Krankheitsverlauf weisen oft Antikörper gegen zyklisch-zitrullinierte Peptide (ACPA) auf, welche eine 80% prozentige Sensitivität und eine 95% prozentige Spezifität besitzen (Dunky 2012). Sowohl der Rheumafaktor, als auch ACPA werden als Diagnoseparameter genutzt und sind teilweise bereits früh im Krankheitsverlauf nachweisbar. Sobald einer dieser Parameter vorliegt, spricht man von einer seropositiven RA. Jedoch korreliert die Schwere der RA nicht mit dem Grad des Antikörpertiters, so dass daraus keine Rückschlüsse auf den Grad der Aktivität und den Krankheitsverlauf gezogen werden können. Auch das Gelenkpunktat wird untersucht und es weist im akuten Stadium oft eine erhöhte Zellzahl auf, ist trüb und besitzt eine reduzierte Viskosität. Mikrobiologisch können keine Keime nachgewiesen werden (Dunky 2012).

Zur Bildgebung werden das konventionelle Röntgen, die Sonographie und die Magnetresonanztomographie genutzt. Im konventionellen Röntgen zeigen sich Weichteilschwellungen, Verschmälerung des Gelenkspalts, Demineralisierungen, Knochenzysten, Subluxationen, Destruktionen des Knochens und Ankylosen. Die bildgebenden Verfahren dienen der Einteilung in die einzelnen Stadien (Dunky 2012).

Die Sonographie weist bereits kleine Gelenksergüsse nach. Zudem können die Ausprägung der Vaskularisation und somit auch der Grad der Aktivität bestimmt werden. Eine akute Entzündung stellt sich durch eine Hypervaskularisation dar. Auch Schwellungen der Gelenkkapsel und das umgebende Gewebe, wie Sehnen, Bänder und Muskeln, können untersucht werden (Dunky 2012).

Die Magnetresonanztomographie kann zur genaueren Untersuchung des Krankheitsgeschehens hinzugezogen werden. Der Gelenkknorpel, die Kapsel, die Sehnen und Bänder und Veränderungen in der Markhöhle lassen sich hier besonders gut beurteilen, insbesondere wenn es sich dabei um geringgradige Veränderungen im Gewebe handelt (Dunky 2012).

1.3 ACR/EULAR Klassifikation (Scoring-System)

Für die Erkennung und die Diagnosestellung einer frühen RA wurde die ACR/EULAR Klassifikation entwickelt. Ziel ist es, durch eine frühe Diagnose rechtzeitig eine Therapie zu beginnen, bevor es zu Destruktionen von Gelenken kommt. Bei Anwendung des Scoring-Systems ist es notwendig, dass mindestens eine sichere Synovitis in einem der Prä-dilektionsgelenke (Handgelenk, PIP, MCP, MTP) nachgewiesen wird. Wenn mindestens 6 Punkte erreicht werden, kann eine RA diagnostiziert werden.

Ausmaß der Gelenkbeteiligung¹ (0-5)		¹ Definition von „Gelenkbeteiligung“: <ul style="list-style-type: none"> • Jedes geschwollene Gelenk • Jedes druckschmerzhafte Gelenk (außer DIP 1, MTP 1, CMC 1) • Jedes weitere Gelenk, in welchem Synovitis mittels MRT oder Ultraschall nachgewiesen wird (optional).
1 großes Gelenk ²	0	
2-10 große Gelenke	1	
1-3 kleine Gelenke ³ (große Gelenke nicht gezählt)	2	
4-10 kleine Gelenke (große Gelenke nicht gezählt)	3	
>10 Gelenke (zumindest ein kleines Gelenk)	5	
Serologie (0-3)		² Definition des „großen“ Gelenks: Schulter, Ellbogen, Hüfte, Knie, Sprunggelenk
Negativer RF + negative ACPA	0	
Niedrig positiver RF / hoch positiver ACPA	2	
Hoch positiver RF / hoch positiver ACPA	3	³ Definition des „kleinen“ Gelenks: MCP, PIP, MTP 2-5, Handgelenk <u>NICHT</u> : DIP, CMC1, MTP1
Symptomdauer (0-1)		
<6 Wochen	0	
≥6 Wochen	1	
Akutphaseparameter (0-1)		(Dunky 2012)
Erhöhtes CRP / erhöhte BSG	1	
≥6= Klassifikation als definitive RA		

1.4 Therapie

1.4.1 Nichtsteroidale Antirheumatika

Lange konnte die RA lediglich mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) und Kortison behandelt werden. Die NSAR besitzen eine schnelle analgetische und antiphlogistische Wirkung. Dies erfolgt über die Hemmung der Cyclooxygenase (COX) und die damit verbundene Prostaglandinbiosynthese. Die Art der COX-Hemmung bzw. die Selektivität, dient zur Einteilung der NSAR-Wirkstoffgruppen. Die nicht COX-2 selektiven NSAR, wie

z.B. Diclofenac, Ibuprofen oder Naproxen, können zu mehr gastrointestinalen Nebenwirkungen führen. Vor allem die Kombination von NSAR und Acetylsalicylsäure erhöht das Ulcusrisiko. Deswegen sollte bei Risiken und längerer NSAR-Therapie ein Magenschutz in Form von Protonenpumpenhemmern (PPI) erfolgen. Durch den Einsatz von hochselektiven COX-Hemmern (Coxibe, wie Celecoxib, Etoricoxib) lässt sich das Risiko für gastrointestinale Nebenwirkungen reduzieren. Bislang wurde davon ausgegangen, dass die Coxibe mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergehen, weshalb eine Kontraindikation bei manifester koronarer Herzkrankheit und bei Herzinsuffizienz NYHA (II-IV) galt (van de Sande, Marleen G und Baeten 2016; Lange 2015; Dunky 2012; Kiener et al. 2006; Lee und Weinblatt 2001; Scott et al. 2010). Nissen et al. (2016) zeigten jedoch kürzlich, dass Celecoxibe im Vergleich zu Ibuprofen und Naproxen in Normaldosierung kein höheres kardiovaskuläres Risiko aufweisen. Im Allgemeinen sollte die Indikation zum Einsetzen von NSARs begründet sein und eine bedachte Dosierung erfolgen.

1.4.2 Glukokortikoide

Die antientzündliche Wirkung von Steroiden ist bereits seit Mitte des vergangenen Jahrhunderts bekannt. Sie setzt bereits nach Stunden bis wenigen Tagen ein. Die Steroide werden vor allem im akuten Krankheitsgeschehen eingesetzt und zusätzlich bei Beginn einer Basismedikation, da die Wirkung der Basismedikamente verzögert einsetzt. Als orale Steroide werden häufig Prednisolon, Prednison oder Methylprednison verwendet, die sich in ihrer Äquivalenzdosis kaum unterscheiden. Initial wird meist mit einer Dosis von 20-30mg begonnen, welche dann kontinuierlich reduziert wird. Die Langzeittherapie mit Steroiden kann eine Vielzahl von Nebenwirkungen mit sich bringen, unter anderem ein erhöhtes Osteoporoserisiko. Aus diesem Grund sollte eine Prophylaxe in Form von 800-2000 IE Vitamin D und 1-1,5 g Kalzium täglich durchgeführt werden. Zur Vermeidung eines Cushing-Syndroms sollte langfristig eine Steroiddosis unter 7,5 mg Tagesdosis (besser 5 mg) angestrebt werden.

Trotz verschiedener Nebenwirkungen, wie z.B. Induktion eines Diabetes mellitus Typ II, Osteoporose und Blutdruckentgleisungen, spielen Steroide durch ihren hemmenden Einfluss auf die destruirenden Ereignisse im Gelenk eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus Methotrexat (MTX) und Steroide einen positiven Effekt sowohl auf den klinischen Verlauf als auch auf die Progression der Erkrankung im konventionellen Röntgen hat. Insbesondere bei einer späten Manifestation der RA können Steroide als Monotherapie in einer niedrigen Dosis sehr gute Ergebnisse auch langfristig erzielen (Lange 2015; Dunky 2012; Kiener et al. 2006; Lee und Weinblatt 2001; Abella et al. 2014; Scott et al. 2010; van de Sande, Marleen G und Baeten 2016).

1.4.3 Weitere Therapeutika der RA

Die Disease-Modifying Antirheumatic Drugs (DMARD) sind eine Reihe von Medikamenten, die eine krankheitsmodulierende Wirkung aufweisen. In erster Linie werden sie eingesetzt, um weitere Gelenkschädigungen zu verhindern, bzw. den Krankheitsverlauf zu verzögern und Steroide einzusparen. Aufgrund des verzögerten Wirkeintritts aller Medikamente, der ca. 4 bis 16 Wochen beträgt, wird in der Übergangsphase Kortison eingesetzt. Tabelle 1 zeigt die aktuell zugelassenen Medikamente in Deutschland (DGRh 2017).

Bei der RA handelt es sich um eine chronische Entzündung, welche durch ein Ungleichgewicht des eigenen Immunsystems entsteht. Dabei spielen Zytokin-vermittelte Prozesse eine wichtige Rolle. Zytokine wie z.B. TNF- α und IL-1 β rückten stärker in den Fokus der Forschung. Durch die gezielte Blockade entzündungsfördernder Moleküle konnte das Krankheitsgeschehen eingeschränkt werden (Dunky 2012).

Die Zytokin-blockierenden Hemmstoffe werden unter dem Begriff „Biologika“ zusammengefasst. Sie nehmen auf Zytokinebene Einfluss auf die Entzündungsreaktion. Biologika sind gentechnisch hergestellte Antikörper, die sich u.a. gegen verschiedene proinflammatorische Zytokine richten. Antikörper gegen TNF- α werden bereits seit Jahrzehnten eingesetzt. Die Hemmung weiterer Zytokine folgte. Noch immer sind weitere Zytokine und ihre mögliche Blockade Gegenstand der Forschung. Die Therapie erfolgt durch subkutane Injektionen oder durch Infusionen, da der Abbau der Proteine im Verdauungstrakt eine orale Einnahme ermöglicht.

Der Einsatz von Hemmstoffen, die intrazelluläre Signaltransduktionswege blockieren, zeigte auch Erfolge. Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK), z.B. p38-MAPK, Janus-Kinasen und „extracellular signal-related kinase“ (ERK), sind an der Regulierung und der Aktivität vieler inflammatorischer Zytokine beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass sie auch konstitutiv im RA-Synovium exprimiert werden. Bislang sind verschiedene Substanzen in Erprobung. Im Jahr 2017 wurden zwei Substanzen, welche Januskinasen hemmen, in Deutschland zur Therapie der RA zugelassen. In Zukunft wird sich zeigen, ob und inwieweit weitere Substanzen zur Behandlung der RA zum regulären Einsatz kommen (Lange 2015; Frommer et al. 2012a).

Wirkstoff	Präparate/Handelsname	Wirkungsmechanismus
Abatacept	Orencia	Fusionsantikörper, hemmt die Aktivierung von T-Zellen
Adalimumab	Humira	TNF- α -Blocker
Anakinra	Kineret	IL-1-Rezeptorblocker
Azathioprin	Azathioprin, u.a.	Antimetabolit (Purinanalogon)
Baricitinib	Olumiant	JAK-Inhibitor
Certolizumab	Cimzia	TNF- α -Blocker
Chloroquin	Resochin	Malariatherapeutikum
Cyclosporin	Sandimmun, u.a.	Hemmt Produktion von proinflammatorischen Zytokinen
Etanercept	Enbrel Benepali (Biosimilar)	TNF- α -Blocker (Rezeptorfusionsprotein)
Golimumab	Simponi	TNF- α -Blocker
Hydroxychloroquin	Quensyl	Malariatherapeutikum
Infliximab	Remicade Inflectra (Biosimilar) Remsima (Biosimilar) Flixabi (Biosimilar)	TNF- α -Blocker
Leflunomid	Arava	Hemmt Zellteilung der T-Zellen und die Migration von Leukozyten
Methotrexat	Metex	Folsäureantagonist
Rituximab	Mabthera Truxima (Biosimilar)	CD-20-Antikörper, selektive Depletion der CD20-positiven B-Zell-Subpopulation
Sarilumab	Kevzara	IL-6-Rezeptor-Antagonist
Sulfasalazin	Azulfidine	u.a. Hemmung des Arachidonsäurestoffwechsels
Tocilizumab	Ro-Actemra	IL-6-Rezeptor-Antagonist
Tofacitinib	Xeljanz	JAK-Inhibitor

Tabelle 1: Übersicht über die aktuell eingesetzten DMARDs in Deutschland

Quelle: DGRh 2017, Schiller 2011

1.5 Gelenkveränderungen im Rahmen der RA

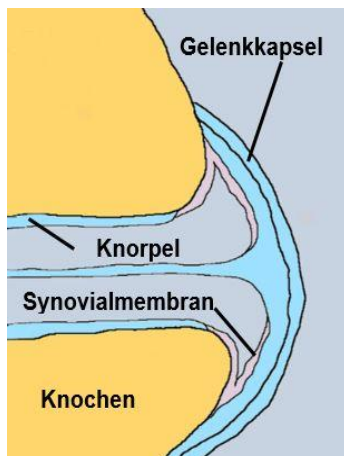


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Gelenkaufbaus

Quelle: Eigene Darstellung

Gelenke werden infolge des Aneinandergrenzens von mindestens zwei Knochen gebildet. Diese Verbindung ermöglicht Bewegungen und die Kraftübertragung zwischen den einzelnen Knochen. Der Grad der Beweglichkeit hängt von der Art der Verbindung der aneinandergrenzenden Knochenflächen ab.

Die Verbindungen werden in drei Gruppen eingeteilt: articulationes fibrosae (bandhaft), articulationes cartilaginae (knorpelhaft) und articulationes synoviales (Diarthrosen).

Die Diarthrosen bestehen aus einem mit Synovialflüssigkeit gefüllten Gelenkspalt und ermöglichen den höchsten Grad der Beweglichkeit (s. Abb. 1). Die angrenzenden Knochenanteile sind mit Knorpel überzogen und der gesamte Gelenkspalt ist von der Membrana synovialis (Synovialmembran, Synonym: Synovium) begrenzt. Zusätzlich überzieht ein straffes faseriges Bindegewebe, die Capsula fibrosa (Gelenkkapsel), den gesamten Komplex. Diese ist am Rand der Gelenkflächen mit dem Knochen verwachsen. Sowohl die Capsula (Gelenkkapsel) als auch die Membrana werden durch viele Gefäße und Nervenstrukturen durchzogen, welche verschiedene Kräfte absorbieren können und das Gelenk somit schützen. Das Synovium begrenzt diejenigen Gelenkanteile, die nicht aneinandergrenzen und grenzt an das Gelenkinnere. Sie besteht aus einer Deckschicht, die Intima, und einer subintimalen Zellschicht. Die Intima besteht üblicherweise lediglich aus ein bis vier Zellschichten, die eine Dicke von 20 bis 40 µm beträgt. Die Subintima hingegen besteht aus deutlich mehr Schichten und kann eine Dicke von bis zu 5 mm aufweisen (Dunky 2012; Hochberg et al. 2015). Die Synovialmembran sezerniert und resorbiert die Synovialflüssigkeit, die das Übereinandergleiten der Gelenkflächen erleichtert. Die Synovialflüssigkeit besteht aus einer leicht alkalischen Flüssigkeit und sie beinhaltet neben verschiedenen Bestandteilen des Bindegewebes und Glykoproteinen auch Zellen (ca. 60 Zellen/ml) (Dunky 2012). Die synovialen Blutkapillaren ermöglichen die Sekretion der Synovialflüssigkeit, da es sich hierbei um ein Dialysat des Blutes handelt.

Bei RA-Patienten ist die Synovialmembran durch Hyperplasie, verstärkte Vaskularisation und das Einwandern von Entzündungszellen charakterisiert (s. Abb. 2). Die fortschreitende Gelenksdestruktion wird durch verschiedene Prozesse, wie z.B. Produktion und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, begünstigt (Choy und Panayi 2001).

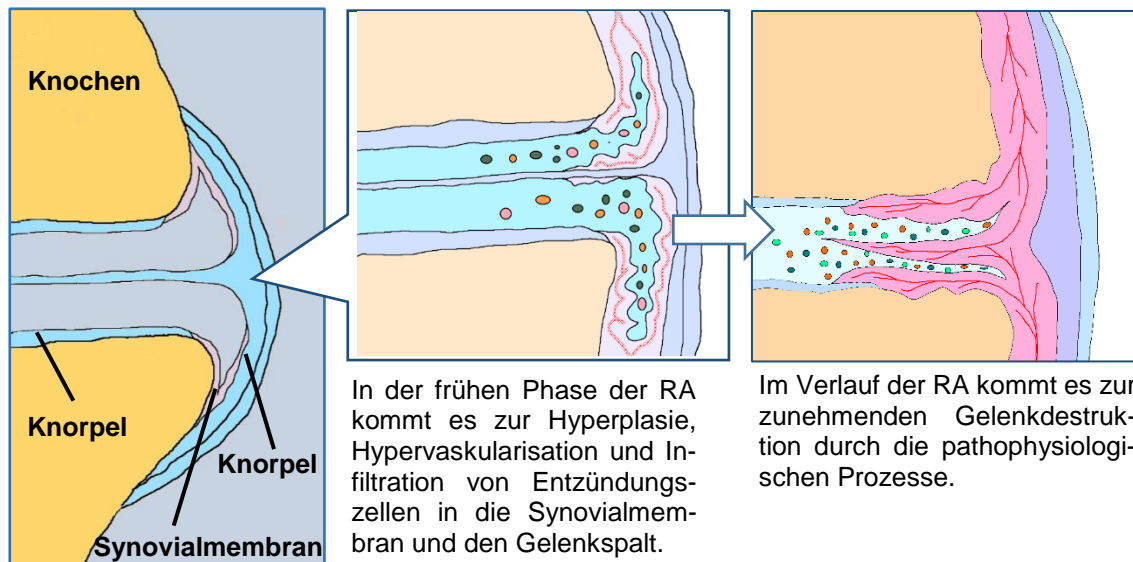


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Gelenkdestruktion
 Quelle: Eigene Darstellung

1.6 Synoviale Fibroblasten (SF)

Die Intima des Synovialgewebes besteht aus gewebsspezifischen Makrophagen Typ I-Synoviozyten) und synovialen Fibroblasten (SF, Typ II-Synoviozyten), die primär als essentielle Versorgungszellen dienen und sowohl Hyaluronsäure als auch Lubricin/Proteoglykan 4 produzieren und sezernieren. Dieses Zellgebilde ist dicht aneinandergereiht. Die subintimale Zellschicht stellt ein zellärmeres Gewebe aus Fibroblasten und Makrophagen dar, das sich in einer lockeren gefäßdurchzogenen Bindegewebsmatrix befindet (Turner und Filer 2015). Beide Zelltypen sind auch dominierend im entzündeten Gewebe bei Patienten mit RA.

Die SF zeigen in der RA einen tumorzellähnlichen Phänotyp. Charakteristisch für diesen ist eine erhöhte Proliferationsrate, Invasionsfähigkeit und Resistenz gegenüber Apoptose, wodurch es zu einer Hyperplasie der Intima kommt. Die SF können neutrophile Granulozyten mobilisieren. Nach Stimulation über Toll-like-Rezeptoren (McGarry et al. 2015; Turner und Filer 2015) und anderer Oberflächenrezeptoren produzieren sie verschiedene Zytokine, wie z.B. IL-6, Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Cathepsine, welche die Entzündung aufrechterhalten und zur Knorpel-/Knochendestruktion führen. Zudem sind die SF bei der RA fähig das Wachstum und die Funktion anderer Zellen, insbesondere der Immunzellen, zu beeinflussen. Hierzu sezernieren sie verschiedene Wachstumsfaktoren, wie z.B. „monocyte chemoattractant protein“ (MCP-1), „macrophage colony stimulating factor“ (M-CSF), IL-34 oder „granulocyte-macrophage colony stimulating factor“ (GM-CSF), die nicht nur zur Zelldifferenzierung beitragen, sondern auch die Migration von Monozyten und die Aktivierung von Makrophagen im Synovium

unterstützen (Darrieutort-Laffite et al. 2014). Dieses Verhalten zeigen SF auch im gesunden Gelenk weniger stark ausgeprägt, da sich das Bindegewebe aufgrund der mechanischen Belastung im ständigen Umbau befindet.

Die Interaktion der SF mit Makrophagen und Lymphozyten lässt sich bei den Entzündungsprozessen in der RA nachweisen. Die von den Makrophagen und Monozyten stammenden Zytokine führen zur Zytokinproduktion und Expression von Adhäsionsmolekülen durch die SF. Zusätzlich führen Faktoren wie TNF- α und IL-1 β zur anhaltenden Aktivierung der SF bei der RA (Darrieutort-Laffite et al. 2014).

Durch Zellkontakt der T- Lymphozyten mit den SF kommt es ebenfalls zur IL-6- und IL-8-Produktion der SF (Lowin und Straub 2015). Der Zellkontakt erfolgt unter anderem durch membrangebundene TNF-Moleküle. TNF führt zudem zur Resistenz der SF gegenüber dem Fas-Apoptose-Signalweg (Turner und Filer 2015). Außerdem sezernieren SF den RANK (Receptor Activator of NF- κ B)-Ligand, der die Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen fördert (Shigeyama et al. 2000) und zu Erosionen im Knochen führt, und das Dickkopf-related protein 1 (Dkk1) (Diarra et al. 2007), welches die anabole Funktion der Osteoblasten hemmt, wodurch die Reparatur der Erosionen verhindert wird.

Die Knorpelmatrix wird normalerweise durch Chondrozyten versorgt. Bei der RA sezernieren Chondrozyten selbst, sowie andere synoviale Zelltypen MMPs und Cathepsine, wodurch die Knorpelmatrix geschädigt wird. Sie werden hauptsächlich durch Zytokine, u.a. produziert von den RASF, dazu angeregt, vermehrt Matrix-abbauende Faktoren zu bilden. RASF fördern zudem durch die Bildung von *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1 und IL-6 eine verstärkte Angiogenese im Synovialgewebe (Neumann et al. 2010a). Somit fördern die SF direkt über proinflammatorische Faktoren und indirekt über die Aktivierung und die Rekrutierung von Immunzellen den Entzündungsprozess und die Matrixdestruktion in der RA (Chang et al. 2010).

1.7 Die Migrationsfähigkeit der RASF

Im Zuge der RA kommt es charakteristischerweise im Krankheitsverlauf zum Befall verschiedener Gelenke. Initial wurde hauptsächlich den Immunzellen eine destruiende Rolle bei der RA zugesprochen (Ma und Pope 2005; Looney 2006; Choy und Panayi 2001). Im SCID-Mausmodell (*severe combined immunodeficiency mouse model*) konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die RASF nicht nur in der Lage sind lokal Knorpelgewebe zu invadieren, sondern auch durch das Gefäßsystem zu wandern und das kontralateral eingesetzte Knorpelimplantat zu zerstören (Lefèvre et al. 2009). Hierbei wurde

humanes Knorpelgewebe in einer Trägermatrix subkutan in gegenüberliegende Flanken der Maus implantiert. Das ipsilaterale Knorpelimplantat enthielt zusätzlich RASF.

Die RASF invadierten dabei sowohl den ipsilateralen, co-implantierten Knorpel als auch nach einer gewissen Zeit den kontralateral implantierten Knorpel (ohne direkte Beigabe von RASF) und führten zur Destruktion der beiden Knorpelimplantate. Weitere Experimente wiesen die Migrationsfähigkeit der RASF durch das Gefäßsystem nach, wodurch der Befall des kontralateralen Knorpelimplantats ermöglicht wird (Lefèvre et al. 2009). Selbst die Implantation der RASF 14 Tage vor der Implantation des kontralateralen Knorpels oder die Injektion der Zellen nach Einheilung der Knorpelimplantate führte aufgrund der Migrationsfähigkeit der RASF zur Destruktion der Knorpelimplantate. Dies geschah ohne Einfluss weiterer Stimuli, z.B. der Präsenz von Entzündungszellen, in den immundefizienten SCID-Mäusen (Lefèvre et al. 2009).

Die Migrationsfähigkeit der Fibroblasten ist bereits über kürzere Distanzen, wie z.B. bei der Wundheilung, bekannt (Lafyatis et al. 1989), eine Migration über längere Distanzen wurde jedoch kürzlich erstmals beschrieben (Lefèvre et al. 2009).

1.8 Adhäsionsmoleküle und die Rolle des vaskulären Systems

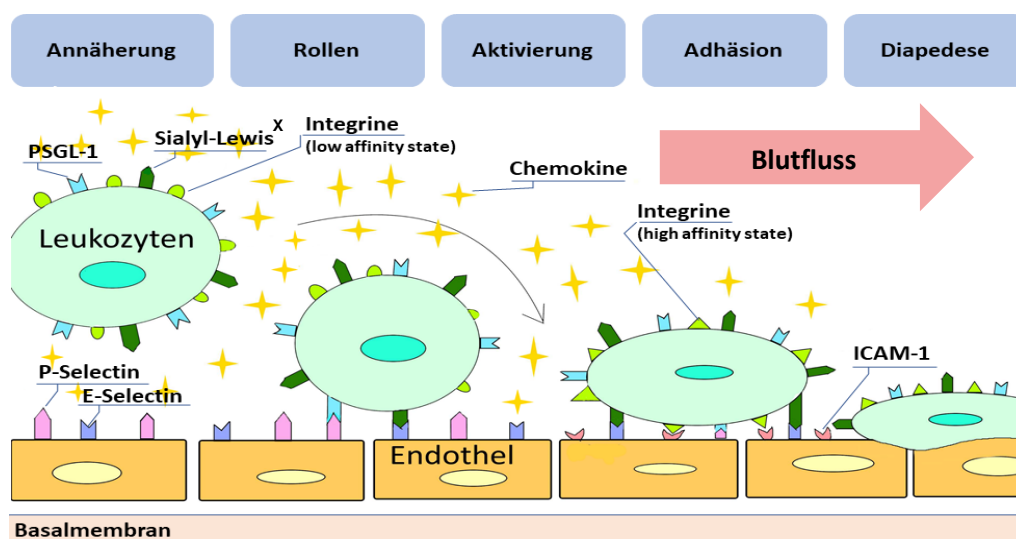


Abbildung 3: Die Migration der Leukozyten
Quelle: Eigene Darstellung

Während des Blutflusses konzentrieren sich die zirkulierenden Zellen, wie z.B. Leukozyten, in der Mitte des Gefäßlumens. Aufgrund von entzündlichen Prozessen kommt es zu Veränderungen der Hämodynamik, so dass es zur lokalen Verringerung der Flussgeschwindigkeit im Bereich eines entzündeten Areals kommt (Muller 2013). Durch die Reduktion der Flussgeschwindigkeit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen mit dem Endothel in Kontakt treten (Abb. 3; Annäherung).

Die Adhäsion von Zellen an das Endothel wird über verschiedene Schritte vermittelt. Drei verschiedene Gruppen von Adhäsionsmolekülen sind daran beteiligt: CAMs (*cell adhesion molecules*), Selectine, Integrine. Die Selectine werden auf den Endothelzellen lokal induziert und richten sich im Fluss auf. Sie binden ihre Liganden auf den zirkulierenden Zellen (wie z.B. Leukozyten) und wirken dabei wie Anker (Vestweber 2015). Verschiedene inflammatorische Prozesse führen dazu, dass z.B. P-Selectin aus den Weibel-Palade-Körperchen an die Zelloberfläche gebracht werden (Muller 2013). Hier kommt es z.B. zur Interaktion mit dem P-Selectin Glykoprotein Liganden 1 (PSGL-1). Durch die Bindung der Selectine an ihre Liganden (z.B. Sialyl Lewis^x) kommt es zur Reduktion des Flusses der Leukozyten (Abb. 3; Rollen; Muller 2013).

Durch die Scherkräfte im Fluss löst sich die Bindung jedoch immer wieder und die Zellen rollen über das Endothel. Es kommt schließlich zu einer über Chemokine vermittelten Aktivierung der Leukozyten (Abb. 3; Aktivierung; Muller 2013). Mittels G-gekoppelter Rezeptoren folgt eine Aktivierung der Integrine auf der Zelloberfläche der Leukozyten.

Die Integrine der über das Endothel rollenden Zellen binden unter anderem an ICAM-1 und VCAM-1 der EC (s. Abb. 3: Aktivierung, Adhäsion; Muller 2013). Diese Bindung ist konstant. Hierdurch bewegen sich die Leukozyten langsamer über das Endothel und sie bereiten sich auf die Diapedese vor (Abb. 3; Diapedese; Muller 2013). Dafür nehmen die Leukozyten eine amöboide Zellform ein. Anhand von Chemokingradienten werden die migrierenden Zellen zur gewünschten Zielregion, wie z.B. zum Entzündungsherd, geleitet. Dies erfolgt unter anderem durch die Bindung von Integrinen und an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix, wie z.B. Fibronectin und Kollagen (Ley et al. 2007; Kunkel und Butcher 2003; Bombara et al. 1993; Butcher und Picker 1996; Springer 1995; Carlos und Harlan 1994). Auf diese Weise gelangen Zellen aus dem Blut in das entzündete Gewebe.

Diese Mechanismen scheinen auch in der RA bzw. bei der Migration der RASF eine wichtige Rolle zu spielen. Die RA weist ein symmetrisches und progredientes Krankheitsbild mit Befall weiterer Gelenke im Verlauf auf. Noch immer ist der genaue Pathomechanismus der Erkrankung ungeklärt. Humorale und zelluläre Faktoren nehmen vermutlich zu Beginn Einfluss auf die Erkrankung (Dunsky 2012). Des Weiteren spielt auch das Gefäßsystem eine wichtige Rolle (Lefèvre et al. 2009).

Im Rahmen der Leukozytenmigration interagieren die migrierenden Zellen und Endothelzellen (EC) interagieren. Beide Zellarten exprimieren verschiedene Adhäsionsmoleküle, die eine gegenseitige Adhäsion fördern und auch zirkulierende Zellen „einfangen“ können.

Die Expression der Adhäsionsmoleküle wird durch verschiedene zirkulierende Chemokine und Zytokine beeinflusst (Ley et al. 2007). Zusätzlich führen Entzündungsfaktoren

aus dem umliegenden Gewebe dazu, EC lokal zu aktivieren und so die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche zu induzieren. In Anbetracht dessen und der Tatsache, dass RASF ein ähnliches Verhalten wie Leukozyten zeigen, wurde vermutet, dass ähnliche Mechanismen bei der Migration der RASF und dem gezielten Befall von Knorpel durch RASF im Zuge der RA eine Rolle spielen können.

Aus diesem Grund wurden ausgewählte Adhäsionsmoleküle der SF und EC in dieser Arbeit näher untersucht. Zudem wurde der Einfluss von ausgewählten Adipokinen und der gängigen Therapeutika, wie z.B. Glukokortikoide und Methotrexat, bezüglich der Expression von Adhäsionsmolekülen und der Zell-Zell-Adhäsion analysiert, da dieser Aspekt bislang ungeklärt ist.

1.8.1 P-Selectin und E-Selectin

P- und E-Selectin sind Transmembranproteine und gehören zur Gruppe der CAMs. Ihre Expression bzw. Präsentation auf der Oberfläche der Zellmembran von EC wird durch Entzündungsfaktoren wie TNF- α und IL-1 β induziert. Beide Selectine binden Sialyl Lewis-ähnliche Glykane, die hauptsächlich von zirkulierenden Leukozyten exprimiert werden. P-Selectin bindet zudem PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), das auch von Leukozyten exprimiert wird (Doré und Sirois 1996). Zou et al. (2005) ist es gelungen zu zeigen, dass E-Selectin ebenfalls in der Lage ist, PSGL-1 zu binden. Die Bindung an E- und P-Selectin ist reversibel. Dadurch können die zirkulierenden Zellen über das Endothel rollen.

Die Selectine spielen im erworbenen sowie angeborenen Immunsystem eine wichtige Rolle. Durch sie werden verschiedene Immunzellen aus dem Gefäßsystem rekrutiert. Im inaktiven Zustand wird P-Selectin in den Weibel-Palade-Körperchen der EC und in α -Granula der Blutplättchen gespeichert. Bei Aktivierung der Zellen wird zunächst P-Selectin, welches intrazellulär gespeichert wird und daher schnell mobilisierbar ist, an die Zelloberfläche transportiert (Doré und Sirois 1996). Auf der Plasmamembran wirkt P-Selectin als Bindungspartner für verschiedene Zellen, wie z.B. Leukozyten. Diese rollen durch Adhäsion an P-Selectin über das Endothel. Die gezielte Expression von P-Selectin ist ein wichtiger Aspekt bei Entzündungsprozessen. Littler et al. (1997) konnten nachweisen, dass P-Selectin im Serum von Patienten mit RA nicht nur erhöht war, sondern auch mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierte (J. A. Koedman et al. 1992; Liu et al. 2010; J. A. Koedman et al. 1992; Steyers und Miller 2014; Littler et al. 1997).

E-Selectin wird im Gegensatz zu P-Selectin nicht in Weibel-Palade-Körperchen oder Granula gespeichert, sondern bei Bedarf transkriptionell reguliert. Es wird ausschließlich von EC nach Aktivierung synthetisiert. Die Transkription von E-Selectin erfolgt sofort

nach der Aktivierung der EC, die Proteinbiosynthese wird initiiert und anschließend das E-Selectin an die Oberfläche der EC transportiert (Bevilacqua et al. 1987). Bei Patienten mit RA konnte im Synovialgewebe eine erhöhte Expression von E-Selectin nachgewiesen werden (Koch et al. 1991).

E-Selectin dient wie P-Selectin dazu, unter Flussbedingungen die Adhäsion von verschiedenen Zellen an das Endothel zu ermöglichen (Abbassi et al. 1993). Beide Adhäsionsmoleküle spielen somit bei akuten und chronischen Entzündungen eine wichtige Rolle (Janeway und Travers 2005).

1.8.2 VCAM-1 und ICAM-1

Durch freigesetzte Zytokine und Chemokine wird das Endothel im Synovium bei entzündlichen Reaktionen aktiviert und weitere Adhäsionsmoleküle werden verstärkt exprimiert. Diese gehören ebenfalls zur Gruppe der CAMs. Sie dienen zur Interaktion von zirkulierenden Zellen mit EC. Dabei werden VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) eine besondere Rolle zugesprochen. Sie gehören zu der Immunglobulin-ähnlichen (Ig-like) Superfamilie (Vestweber 2015), welche durch Zytokine induzierbar sind. Sie sind membrangebunden und Bindungspartner verschiedener Integrine. VCAM-1 und ICAM-1 werden außerdem von synovialen Fibroblasten exprimiert. Verschiedene Versuche zeigen, dass RASF unter TNF- α -Stimulation vermehrt diese beiden Adhäsionsmoleküle exprimieren (Navarro-Hernández et al. 2009; Ahmed et al. 2013; Lee und Weinblatt 2001). Dies bestärkt die Hypothese, dass die RASF gezielt in den Bereich der Entzündung geführt (Lefèvre et al. 2009, 2009) und durch Bindung verschiedener Immunzellen an die RASF zusätzlich weitere Zellen an den entzündlichen Ort rekrutiert werden.

1.8.3 Integrine

Integrine gehören zu einer großen Gruppe von Transmembranproteinen, welche die Zellen mit der Extrazellulärmatrix oder mit anderen Zellen verbinden. Sie gehören auch zu der Gruppe der CAMs. Die Bindung der RASF an die Extrazellulärmatrix erfolgt dabei unter anderem durch die Bindung an Fibronectin-reiche Knorpelanteile und Kollagen. Integrine bestehen aus einer α -Untereinheit, die die Spezifität zum Liganden vermittelt, und einer β -Untereinheit, welche für die intrazellulären Signalwege verantwortlich ist. Durch die Bindung beeinflussen Integrine aktiv die Extrazellulärmatrix (EZM). Über intrazelluläre Signalwege induzieren Integrine nach Ligandenbindung die Expression von bestimmten Proteasen, wodurch sie die Zusammensetzung der EZM mit beeinflussen.

Sie nehmen außerdem Einfluss auf die Proliferation, Apoptose, Migration und Invasion der Zellen. Durch die Ligandenbindung können verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert werden, die z.B. zu einer Zellproliferation führen.

Die Hemmung der Adhäsionsfähigkeit von Zellen, wie z.B. durch Blockade von bestimmten Integrinen, führt zur Apoptose (Lowin und Straub 2011; Stupack et al. 2001). Vermutlich könnte dies eine Fehlregulierung innerhalb der Expression der Integrine bzw. ihrer Signalwege begründen, welche in Tumorzellen nachgewiesen wurde (Stupack et al. 2001). Zudem korreliert die Konzentration der Integrine häufig proportional mit dem Grad der Aggressivität von Tumoren bzw. Bildung von Metastasen (Stupack et al. 2001). Das höhere Aufkommen und die Bindung von Integrinen steigert die Zellrekrutierung von RASF, wodurch vermehrt entzündungsfördernde Zytokine (z.B. IL-6 und IL-8) und MMPs sezerniert werden. Die Integrine wirken dabei wie ein Sensor, welcher auf die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix (EZM) reagiert.

Die meisten Integrine sind hauptsächlich für die Bindung der Zelle an die umgebende Extrazellulärmatrix verantwortlich. Je nach Zellart im Synovium und abhängig von der Lage und des Ursprungs, weisen bestimmte Zellen bei der RA ein spezifisches Integrinmuster auf (Lowin und Straub 2011). Fibroblasten, Makrophagen und EC im Synovialgewebe exprimieren z.B. verstärkt Integrine, die die Untereinheit $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$ beinhalten (Lowin und Straub 2011). Die Intimazellschicht weist ein anderes Expressionsmuster der Integrine auf. Hier adhären die Zellen des Synoviums an den Knorpel, und es sind vermehrt aktivierte Fibroblasten nachweisbar, die wiederum die EZM degradieren und in den Knorpel invadieren (Lowin und Straub 2011).

Basierend auf den aktuellen Studien wurden in dieser Arbeit verschiedene Integrinsubtypen ausgewählt und bezüglich ihrer Rolle bei der Adhäsion der RASF untersucht. Diese sind $\alpha 2$, $\alpha 4$, αv , $\beta 1$ und $\beta 5$ (Lowin und Straub 2011; Mitroulis et al. 2015; Sarkisian und Lafyatis 1999; Huhtala 1995; Lefèvre et al. 2009, 2009).

1.8.4 Cadherin-11

Die synoviale Intimaschicht ist weder dem Epithel noch dem Endothel zugehörig. Sie besitzt keine spezifisch haftenden Strukturen, wie z.B. Desmosomen oder „tight junctions“, zwischen den Zellen. Sie besteht aus dünnen, aber dichten Zellschichten, genannt „lining layer“, die sich im nicht pathologischen Zustand aus ein bis vier Zellreihen zusammensetzen.

Die SF sind mit der umliegenden Matrix und untereinander durch verschiedene Adhäsionsmoleküle verbunden. Dazu gehört auch Cadherin-11. Bei den Cadherinen handelt es sich um Kalzium-abhängige transmembrane Glykoproteine. Sie spielen eine wichtige

Rolle beim Erhalt von Gewebsstrukturen. Sie werden in verschiedene Subtypen unterteilt: klassische Cadherine, desmosomale Cadherine, Protocadherine, unkonventionelle Cadherine (Cadherins 2008). In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Gruppe der klassischen Cadherine, insbesondere Cadherin-11.

Die klassischen Cadherine werden in zwei Gruppen unterteilt: Typ I und Typ II. Epitheliale (E-) und neuronale (N-)Cadherine gehören zu den Typ I-Cadherinen. Cadherin-11 zählt zu den atypischen Typ II-Cadherinen. Cadherin-11 vermittelt vor allem homophile Zell-Zell-Interaktionen und spielt bei der Entwicklung und der Gewebsarchitektur eine wichtige Rolle. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Zellen, die unterschiedliche Cadherinarten exprimieren und miteinander vermischt werden, sich wieder in der Gruppe ihres Cadherin-Subtyps zusammenfinden (Halbleib und Nelson 2006). Cadherin-11 wurde zu Beginn in einer murinen osteoblastischen Zelllinie entdeckt, weshalb es anfänglich „osteoblastic“ (OB)-Cadherin genannt wurde.

Während der Embryonalentwicklung ist Cadherin-11 für die Anordnung der Zellen, die Aggregation und die Morphologie von verschiedenen Geweben verantwortlich (Lee et al. 2007). Im Menschen konnte die mRNA von Cadherin-11 in der Plazenta, Lunge, im Gehirn und im Herz nachgewiesen werden. Eine verstärkte Expression konnte jedoch auch in Osteoblasten und SF gezeigt werden (Chang et al. 2011).

Chang et al. 2011 konnten ebenfalls nachweisen, dass Cadherin-11 für die Entwicklung der Intimaschicht notwendig ist. Zudem zeigten sie, dass die Arthritis in Cadherin-11^{-/-}-Mäusen zu einer stark reduzierten Gelenkszerstörung führte. In Cadherin-11^{-/-}-Mäusen präsentierte sich das Synovium zudem deutlich hypoplastischer als das Synovium von Wildtyp-Mäusen (Lee et al. 2007).

Die Expression von Cadherin-11 ist abhängig von verschiedenen entzündlichen Mediatoren. TNF- α kann z.B. die Expression von Cadherin-11 begünstigen (Park et al. 2011). Immunhistochemisch zeigte sich ein ausgeprägter Nachweis von Cadherin-11 im Pan-nusgewebe und im Knorpel von arthritischen Gelenken beim Menschen (Kiener und Karonitsch 2011).

Zusätzlich konnte im Rahmen von Zellversuchen nachgewiesen werden, dass Fibroblasten, die Cadherin-11 exprimieren, verglichen mit Cadherin-11^{-/-}-Fibroblasten, eine vermehrte Invasions- und Migrationsfähigkeit aufweisen. Die vermehrte Expression von Cadherin-11 durch SF geht zudem auch mit einer verstärkten Produktion von MMPs durch die SF einher (Kiener und Karonitsch 2011). Cadherin-11 defiziente Mäuse reagierten auf eine Arthritisinduktion mithilfe eines Serumtransfermodells mit einer stark abgeschwächten Entzündungsreaktion (Kiener und Karonitsch 2011).

Das Einsetzen von monoklonalen Antikörpern gegen Cadherin-11 führte ebenfalls zur Reduktion der Arthritisaktivität in Wildtypmäusen (Cadherin-11^{+/+}) (Kiener und Karonitsch 2011).

Cadherin-11 scheint somit bei der Entstehung einer Arthritis eine Rolle zu spielen.

1.8.5 CD44

CD44 ist ein Transmembranprotein, das von nahezu allen zellkernhaltigen Zellen exprimiert wird. Es vermittelt Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte (Naor et al. 1997) und ist an inflammatorischen und malignen Prozessen beteiligt (Naor und Nedvetzki 2003).

CD44 wird über das *CD44*-Gen auf dem Chromosom 11 kodiert, welches aus 20 Exons besteht. Dabei sind die ersten und letzten fünf Exons konstante Bestandteile. Durch die zehn verschiedenen Splicingvarianten entstehen eine Vielzahl von Isoformen, die dem Transmembranprotein unterschiedliche Funktionen ermöglichen (Naor und Nedvetzki 2003). CD44 ermöglicht z.B. die Migration von Immunzellen in entzündete Areale bei einer bakteriellen Infektion (DeGrendele 1997). Weiterhin fördert es die Migration von Tumorzellen und begünstigt dadurch auch die Entstehung von Metastasen (Naor et al. 2002).

Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Splicingvarianten des *CD44* führte in Tiermodellen zur Reduktion von inflammatorischen und proliferativen Aktivitäten (Naor und Nedvetzki 2003). Das Synovialgewebe von RA-Patienten weist eine 3,5-fach höhere Konzentration von CD44 auf als das von Patienten mit Arthrose und eine 10,7-fach höhere Konzentration als bei Patienten mit traumatischem Gelenkschaden (Haynes et al. 1991). Zudem konnte eine vermehrte Expression von verschiedenen Splicingvarianten des *CD44* (v.a. CD44v3 und v6-v10) nachgewiesen werden (Croft et al. 1997; Wibulswas et al. 2002). CD44 vermittelt über die Bindung an Hyaluronsäure Kontakte zur extrazellulären Matrix und dient als Ligand für E- und P-Selectin (Dimitroff et al. 2001; Alves et al. 2008), die von EC exprimiert werden.

Diese bisherigen Erkenntnisse warfen die Frage auf, ob CD44 im Rahmen der Migration der RASF auch eine Rolle spielt, da es eine verstärkte Adhäsion der RASF an die EC vermitteln könnte. Um dies zu beantworten, wurde in dieser Arbeit die Expression von CD44 durch RASF untersucht. Aufgrund der vielen Splicingvarianten mussten zwei verschiedene Primerpaare generiert werden, um alle Varianten in die Untersuchung einzuschließen.

1.9 Die Rolle des weißen Fettgewebes bei entzündlichen Prozessen

1.9.1 Allgemeiner Überblick

In den vergangenen Jahren wurde dem Fettgewebe eine immer wichtigere Rolle als endokrines, parakrines, aber auch als immunmodulierendes Organ zugeordnet und es rückte stärker in den Fokus verschiedener wissenschaftlicher Untersuchungen. Initial galt das Fettgewebe hauptsächlich als körpereigenes Energiedepot und thermisch-mechanischer Isolator. Im Verlauf konnten verschiedene Moleküle nachgewiesen werden, die das weiße Fettgewebe synthetisiert. Zu diesen Molekülen gehören auch die sogenannten Adipokine (Abella et al. 2014; Krysiak et al. 2012).

Der Begriff Adipokine schließt alle biologisch aktiven Substanzen des weißen Fettgewebes ein, welche den Energiehaushalt und den Metabolismus regulieren. Sie nehmen jedoch auch Einfluss auf Entzündungsprozesse und metabolische Dysfunktionen. Zu den Adipokinen gehören unter anderem Leptin, Adiponektin, Chemerin, Visfatin, Resistin, Lipocalin 2 und Omentin (Martini 2004). Insbesondere in Zusammenhang mit Essstörungen und Diabetes mellitus wurde den Adipokinen eine wichtige Rolle zugesprochen. Im Verlauf wurde auch ihre immunmodulierende Rolle und ihr Einfluss bei systemischen Entzündungen untersucht (Abella et al. 2014, 2014; Del Prete et al. 2014; Krysiak et al. 2012).

Der Begriff „immunmodulierend“ wird dabei bewusst verwendet, denn sie können entzündungsfördernd und/oder entzündungshemmend wirken. Adiponektin besitzt z.B. sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften. So wirkt es bei der Adipositas kardioprotektiv, jedoch korreliert die Krankheitsaktivität der RA mit der Serumkonzentration von Adiponektin (Arita et al. 2012; Fantuzzi 2008; Hopkins et al. 2007).

Im Zuge entzündlicher Prozesse zeigte sich ein zunehmender Einfluss der Adipokine (Lago et al. 2007), so dass sich die Frage stellt, ob eventuell eine Dysbalance zwischen den Adipokinen bestimmte Entzündungsprozesse fördern könnte. Die Adipokine tragen bei Adipositas zu einem gewissen geringgradigen Entzündungsmilieu bei (Howe et al. 2013; Curat et al. 2006; Gremese et al. 2014). Im Vergleich zu normalgewichtigen Personen weisen Menschen mit Adipositas höhere Konzentrationen von Entzündungsfaktoren, wie z.B. TNF- α , IL-6 und CRP, auf (Lago et al. 2007; Ferraz-Amaro et al. 2013).

Die Entzündungsaktivität der RA wird auch durch Entzündungsfaktoren begünstigt (Del Prete et al. 2014; Krysiak et al. 2012). Verschiedene proinflammatorische Zytokine, wie z.B. TNF- α und IL-1 β , tragen zum Krankheitsgeschehen der RA bei. Da den Adipokinen teilweise eine proinflammatorische Wirkung zugesprochen wird, wurde der mögliche Einfluss auf die RA zunehmend diskutiert. Dabei weisen RA-Patienten erhöhte Adipokinpiegel im Serum und in der Synovialflüssigkeit auf (Abella et al. 2014; Del Prete et al.

2014). Aufgrund dessen wurde der Einfluss ausgewählter Adipokine auf RASF und EC näher untersucht. Dabei lag der Fokus auf den Adipokinen Adiponektin, Visfatin und Resistin in Bezug auf die Adhäsion.

1.9.2 Adiponektin

Adiponektin ist ein Protein, das strukturell Kollagen ähnelt und zusätzlich Ähnlichkeiten zu Komplementfaktoren besitzt. Es wird hauptsächlich von Adipozyten synthetisiert und weist verschiedene Isoformen im Blut auf. Bisher wurden zwei Rezeptoren für Adiponektin identifiziert. AdipoR (Adiponektin-Rezeptor) 1 wird insbesondere im Skelettmuskel und AdipoR2 hauptsächlich in der Leber exprimiert. Im Muskel führt Adiponektin zur Steigerung der Fettsäureoxidation und Glukoseaufnahme. In der Leber kommt es durch Adiponektin zur Reduktion der Glukosesynthese.

Im Rahmen der Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Atherosklerose, Gefäßentzündungen und beim metabolischen Syndrom wurden geringere Konzentrationen von Adiponektin nachgewiesen (Cnop et al. 2003; Arita et al. 2012; Abella et al. 2014). Dabei besitzt Adiponektin verschiedene Funktionen, die bei verschiedenen Erkrankungen gegensätzliche Wirkungen aufweisen können. Ein Beispiel dafür ist, dass im experimentellen System durch Adiponektin die Umwandlung der Makrophagen in sogenannte Schaumzellen verhindert werden kann (Ouchi et al. 2001). Zudem stimuliert es die Produktion von entzündungshemmenden Zytokinen wie z.B. IL-10 und reduziert die Produktion von TNF- α in Makrophagen (Kumada et al. 2004; Hopkins et al. 2007).

Dagegen zeigte Adiponektin eine entzündungsfördernde, lokale Wirkung bei der RA. Kultivierte Chondrozyten steigerten nach Stimulation mit Adiponektin die Expression von MMP-3 und die Sekretion und Aktivität von entzündungsfördernden Faktoren (Tong et al. 2011; Frommer et al. 2010). Adiponektin fördert auch bei RASF die vermehrte Produktion von z.B. IL-6, IL-8, MMP-1, MMP-13 (Kitahara et al. 2009; Kusunoki et al. 2010; Frommer et al. 2010; Frommer et al. 2012b).

Bei RA-Patienten korrelieren die Adiponektinspiegel im Serum und in der Synovialflüssigkeit mit dem Grad des Krankheitsausmaßes in der Bildgebung. In der Bildgebung waren dabei stärkere Schäden in betroffenen Gelenken von RA-Patienten im Vergleich zu Patienten mit Arthrose und gesunden Personen nachweisbar (Giles et al. 2009; Otero et al. 2006; Schäffler et al. 2003). Zudem korrelieren gesteigerte Adiponektinspiegel im Serum mit dem DAS 28 (Disease Activity Score 28) (Ozgen et al. 2010). DAS 28 dient dazu, quantitativ den Krankheitszustand und den Fortschritt einer RA zu beurteilen (Dunky 2012).

1.9.3 Visfatin

Visfatin, ursprünglich "pre-B-cell colony-enhancing factor", PBEF, genannt, wurde anfänglich als Zytokin angesehen, welches Einfluss auf die B-Zellentwicklung besitzt. Im Verlauf konnte nachgewiesen werden, dass die Sekretion hauptsächlich durch das viszerale Fettgewebe erfolgt. Aufgrund dessen entstand der alternative Name „Visfatin“ (Catalán et al. 2011). Leukozyten, insbesondere Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, produzieren vermehrt Visfatin bei Personen mit Fettleibigkeit (Friebe et al. 2011; Catalán et al. 2011; Curat et al. 2006).

Bislang ist kein spezifischer Rezeptor für Visfatin beschrieben. Der Einfluss von Visfatin konnte jedoch z.B. im Rahmen des Insulinsignalwegs und bei entzündungsfördernden Prozessen nachgewiesen werden (Jacques et al. 2012; Catalán et al. 2011; Moschen et al. 2007). Der Visfatinspiegel im Serum korreliert mit dem Grad der Adipositas und dem Diabetes mellitus Typ 2 (Chen et al. 2006). Diese Korrelation lässt sich durch Gewichtsabnahme reduzieren.

Visfatin begünstigt zudem Atherosklerose, die Bildung von instabilen Plaques durch die Einleitung von Entzündungsprozessen und die Aktivierung von Adhäsionsmolekülen von EC (Moschen et al. 2007; Kiener et al. 2006; Lee et al. 2009; Dahl et al. 2007).

In den letzten Jahren zeigten verschiedene Gruppen, dass Visfatin eine Rolle in der RA spielt. Der genaue Pathomechanismus ist jedoch bislang ungeklärt (Brentano et al. 2007; Meier et al. 2012; Evans et al. 2011; Moschen et al. 2007). Visfatin wird vermehrt durch verschiedene Zellen bei Entzündungsprozessen synthetisiert.

Visfatin wiederum kann die Produktion von TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 und IL-1Ra in Lymphozyten erhöhen (Moschen et al. 2007). Es vermittelt die Aktivierung der T-Zellen durch die erhöhte Expression von kostimulierenden Molekülen und fördert die Differenzierung von B- und T-Zellen (Procaccini et al. 2013).

In der RA, wie auch bei anderen entzündlichen Erkrankungen, sind die Werte für Visfatin erhöht (Brentano et al. 2007). RASF exprimieren ebenfalls vermehrt Visfatin. Dies könnte die Adhäsion und Invasion der RASF im Knorpel und die damit verbundene Degradation beeinflussen (Meier et al. 2012). Die Höhe der Visfatinkonzentration korreliert dabei mit dem Grad der Destruktion in der radiologischen Bildgebung (Rho et al. 2009). Die Konzentration von Visfatin im Serum und im Synovium korreliert mit dem Schweregrad der Entzündung, mit der Schwere der Erkrankung und mit dem Grad der Knorpelschädigung (Brentano et al. 2007). Zudem führte die Inhibition von Visfatin im Mausmodell zu einer Reduktion des Krankheitsverlaufes (Gremese et al. 2014; Evans et al. 2011).

1.9.4 Resistin

Resistin wird auch „ADSF“ (adipocyte-secreted factor) oder „FIZZ3“ (found in inflammatory zone 3) genannt. Es gehört zur RELMs (resistin-like molecules) Familie. Resistin bildet multimere Strukturen. Es existiert als Monomer und Dimer. Ein Monomer besteht aus einer nicht-kovalenten Zusammenstellung von drei Protomonomeren (gelegentlich als Trimer bezeichnet), während das Dimer aus zwei Monomeren besteht (gelegentlich als Hexamer bezeichnet), die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Watts et al. 2013).

Durch verschiedene Verfahren ist es möglich, das Dimer zu Monomere zu reduzieren (Banerjee und Lazar 2001). Für die durchgeführten Experimente wurde die dimere Isoform verwendet.

Ursprünglich wurde Resistin hauptsächlich eine Rolle im Insulinsignalweg zugesprochen. Es wurde vermutet, dass es vom weißen Fettgewebe synthetisiert wird. Weitere Untersuchungen ergaben, dass Resistin beim erwachsenen Menschen hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen sezerniert wird. Dies deutete auf eine proinflammatorische Rolle hin (Savage et al. 2001). In Anbetracht dessen zeigten verschiedene Gruppen, dass die Expression von Resistin durch entzündungsfördernde Zytokine in verschiedenen Zellen induziert werden kann. Resistin selbst wiederum induziert die Produktion von z.B. TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β und kann sogar seine eigene Produktion induzieren, z.B. in mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Bokarewa et al. 2005).

Die Injektion von Resistin in Gelenken führte im murinen Versuchsmodell zu einer gesteigerten Synovitis (Bokarewa et al. 2005; Gremese und Ferraccioli 2011; Gremese et al. 2014).

Zusätzlich konnten erhöhte Konzentrationen von Resistin im Serum und in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten nachgewiesen werden (Senolt et al. 2007). Die Expression in der Subintima war ebenfalls höher als bei gesunden Patienten. Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen der Konzentration von Resistin und dem klinischen Krankheitsgrad der RA gezeigt werden (Senolt et al. 2007).

Synoviale Fibroblasten weisen eine vermehrte Expression von IL-6 und TNF- α nach Stimulierung mit Resistin auf (Krysiak et al. 2012). Dies könnte bei der RA zu einer weiteren Aktivierung der RASF führen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Materialien und Enzyme

10x Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Cölbe
Calcein-AM	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 1g/ml Glukose (Low Glucose)	PAA Laboratories, Cölbe
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell, Heidelberg
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	BD Biosciences, Heidelberg
FCS (Fetal Calf Serum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	PAA Laboratories, Cölbe
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAA Laboratories, Cölbe
Rattenschwanzkollagen (RSK)	BD Bioscience, Heidelberg
RNase-Inhibitor	Epicentre® Biotechnologies, Madison, USA
RPMI 1640	PAA Laboratories, Cölbe
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, hier ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	PAA Laboratories, Cölbe
Zellkulturflaschen/Zellkulturplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Einfriervials (Cryo.Vials™)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Kapillarobjektträger (µ-Slide VI ^{0.1} „ibidi Treat“)	Ibidi, Martinsried
Lab Tec Chamber Slides w/Cover (8 Well)	Nalge Nun International, Langenselbold
Pipettenspitzen	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Kunststoffschlauch	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Spritzen (5ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
E-Selectin (Chimär aus rekombinatem humanem E-Selectin und dem konstanten Fragment eines Immunglobulins, rhE-Selectin/Fc Chimera)	R&D Systems, Minneapolis
Accutase	PAA Laboratories, Cölbe
DNase 1	Fermentase, St Leon-Rot
Kollagenase H	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase A	Fermentas, St Leon-Rot

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien, Materialien und Enzyme

2.1.2 Verwendete Medien

Verwendung	Grundmedium	FCS	P/S	HEPES	Zusatz
<i>Fibroblastenmedium</i>	DMEM	10%	1 U/ml	1 mM	
<i>Versuchsmedium</i>	RPMI 1640	10%	1 U/ml	1 mM	
<i>Endothelzellmedium</i>	DMEM	20%	1 U/ml	1 mM	2% ECGS-Lösung
<i>HUVEC-Medium</i>	Endothelial Cell Growth Medium	2% im Supplement Mix	1 U/ml	1 mM	

Tabelle 3: Verwendete Medien

2.1.3 Verwendete Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	Lager-temperatur
<i>ECGS-Lösung</i>	100 mg ECGS, 20 ml serumfreies DMEM	-20 °C
<i>Einfriermedium</i>	9 ml FCS, 1ml DMSO	4 °C
<i>Rattenschwanzkollagen-Lösung</i>	0,25 ml Rattenschwanzkollagen in 9,75 ml sterilem PBS	Raumtemperatur
<i>RNA-Lysepuffer</i>	RLT-Puffer aus RNeasy Midi Kit; Qiagen, Hilden, Zugabe von 10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml des Puffers	Raumtemperatur
<i>RNase-Puffer</i>	50 mM TRIS-HCL, 130 mM NaCl, 2 mM EDTA und 0,1 mg/ml azetyliertes BSA in destilliertem H ₂ O lösen	Raumtemperatur

Tabelle 4: Verwendete Lösungen

2.1.4 Verwendete Oligonukleotide (Primer)

Gen	Sequenz	MgCl₂ (mM)	Temperatur (°C)
Cadherin-11 (forward) Cadherin-11 (reverse)	GAAGGCAAAGAAAGAACC CCCAGGTCTAGGCATGTACT	3,5	50
Integrin α2 (forward) Integrin α2 (reverse)	AGAAGTCTGTTGCCTGCGAT CTTGGAACCTGAGAGACGCC	4,5	56
Integrin α4 (forward) Integrin α4 (reverse)	AAAATGGATGGCCTTCTGTG TCTTGGTGGAGACTCTGCCT	3,5	48
Integrin αv (forward) Integrin αv (reverse)	GCTCATCGTTTCCATTCCACT TCCAGCCTTCATTGGGTTTC	3,5	50

Integrin β1 (forward) Integrin β1 (reverse)	ATCCCAGAGGCTCCAAAGAT CCCCTGATCTTAATCGCAA	4	56
Integrin β5 (forward) Integrin β5 (reverse)	TGCCTTGCTTGGAGAGAAAT AATCTCCACCGTTGTTCCAG	4,5	56
VCAM-1 (forward) VCAM-1 (reverse)	GCAAGAAGGTGGCTCTGTGA AAAGGTGCTGTAGATTCCCATT	3,0	63
ICAM-1 (forward) ICAM-1 (reverse)	TCCTCAGTCAGATACAACAGCATT CTTGAGTCTTGCTCCTTCCTCTT	3,0	63
P-Selectin (forward) P-Selectin (reverse)	CAGGATCTCCCAGTTCCAAA CCAGTTTCCAGTAGCCAAGC	3,0	60
CD44_v5 (forward) CD44_v5 (reverse)	CCATCCCAGACGAAGACAGT TGCTCCACCTTCTTGACTCC	4,0	60
CD44_v8 (forward) CD44_v8 (reverse)	GTGGAGGACAGAAAGCCAAG ACCCAATCTTCATGTCCAC	4,0	60
18S rRNA (forward) 18s rRNA (reverse)	CGGCTACCACATCCAAGGAA GCTGGAATTACCGCGGCTGC		

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide (Primer)

2.1.5 Verwendete Kits

RNeasy Midi Kit	Qiagen, Hilden
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
Absolute qPCR SYBR Green Capillary Mix	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 6: Kits

2.1.6 Geräte

Brutschrank (C150)	Binder GmbH, Tuttlingen
Mikroskop (Axiovert 200)	Carl Zeiss MicroImaging GmbH
Mikroskop (DM IRB)	Leica Microsystems, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Superior, Marienfeld
PCR-Gerät (GeneAMP PCR System 9700)	PE Applied Biosystems
Rotationsschüttler (Unimax 1011)	Heidolph Instruments, Schwabach
Spritzenpumpe (100CE)	Kd Scientific, London
Vertikale Gelelektrophoresekammer (Modell S2)	Gibco, Karlsruhe

Tabelle 7: Geräte

2.1.7 Verwendete Zellen

Synoviale Fibroblasten	Primäre Zellen, isoliert aus Synovialgewebe von Patienten mit gesicherter RA-Diagnose	Pa-
Endothelzellen	Primäre Zellen, isoliert aus Varizen	
HUVEC	Zelllinie	

Tabelle 8: Verwendete Zellen

2.1.8 Stimulanzen

2.1.8.1 Adipokine

Adiponektin	BioVendor;	Lot-Nr. AP-13-085;	Produkt-Nr: RD172023100
Visfatin	BioVendor;	Lot-Nr. RD-1223;	Produkt-Nr: RD172098100
Resistin	Peprotech;	Lot-Nr. 1207235;	Produkt-Nr: 450-19
TNF-α	R&D;	Lot-Nr. AA2613032;	Produkt-Nr: 210-TA/CF

Tabelle 9: Adipokine

2.1.8.2 RA-Therapeutika

Glukokortikoide	Handelsname	
Prednisolon	Prednisolut® 25mg L	Mibe GmbH, Brehna
Dexamethason	Dexa 4mg inject Jenapharm®	Mibe GmbH, Brehna
Folsäureantagonist	Handelsname	
Methotrexat	Metex®	Medac GmbH, Wedel

Tabelle 10: RA-Therapeutika

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung humaner synovialer Fibroblasten

Die verwendeten synovialen Fibroblasten stammten aus entfernten Kniegelenken von Patienten mit gesicherter Diagnose einer RA. Die Entfernung des Kniegelenks erfolgte aufgrund einer Gelenkersatzoperation. Diese Operation wurde in der orthopädischen Abteilung des Markus-Krankenhauses Frankfurt durchgeführt und unterlag der Zustimmung der Ethikkommission Gießen. Die Patienten willigten durch schriftliche Einverständniserklärungen der weiteren Verwendung des entfernten Gewebes ein.

Das Gewebe wurde nach Entnahme in einem verschließbaren Behälter mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gegeben und zur weiteren Bearbeitung transportiert. Das Synovium wurde durch ein Skalpell vom Knochen/Knorpel entfernt und in ca. 1 mm³ große Stücke geteilt.

Einige Proben wurden für histologische Untersuchungen eingefroren bzw. in Paraffin eingebettet. Die übrigen Gewebestücke wurden bei Raumtemperatur für eine Stunde mit einer 10%igen Dispase-Lösung (Dispase II) auf einem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 20 ml Fibroblastenmedium (DMEM-basiert, siehe Tabelle 3 unter Punkt 2.1.2. Verwendete Medien) zum Beenden der enzymatischen Abbaureaktion hinzugegeben.

Um die großen und unverdaulichen Gewebestücke zu entfernen, wurde die Zellsuspension über ein Zellsieb mit 70 µm Porenweite gegeben. Die gesiebte Zellsuspension wurde anschließend für 10 Minuten bei 300xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde im Fibroblastenmedium resuspendiert und in 25 oder 75 cm²-Zellkulturflaschen bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert.

2.2.2 Kultivierung der RASF mit DMEM und RPMI 1640

Die isolierten RASF wurden, nachdem eine Konfluenz von ca. 90% erreicht wurde, mit PBS gewaschen und mit 1x Trypsin/EDTA inkubiert, bis sich die adhärenen Zellen gelöst hatten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Fibroblastenmedium beendet. Die Zellsuspension wurde anschließend für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert und das Zellpellet erneut in Fibroblastenmedium aufgenommen. Die Hälfte der Zellsuspension wurde in neue Zellkulturflaschen überführt (Passagierung → Erhöhung der Passage um 1) oder für spätere Versuche in Kryogefäßen in Flüssigstickstoff eingefroren.

Nach Kultur der Zellen bis Passage 3 wurde nach einmaligem Waschen mit PBS das Standardmedium durch 10 ml RPMI-basiertem Versuchsmedium (siehe Tabelle 3 unter Punkt 2.1.2. Verwendete Medien) ersetzt. Die weitere Kultivierung fand in einem Inkubator mit 5% CO₂ statt. Nach ca. zwei bis drei Tagen wurde das Medium durch frisches Versuchsmedium ersetzt. Nach erneutem Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% wurden die Zellen, wie oben beschrieben, von der Zellkulturflasche gelöst und auf zwei bis drei neue 75 cm²-Zellkulturflaschen verteilt. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis sich die Zellen in Passage 6 (für statische und dynamische Adhäsionsassays) oder Passage 7 (für molekulare Analyse der Expression der Adhäsionsmoleküle) befanden.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von RASF

Nach der Zentrifugation wurde die Hälfte des Zellpellets aus einer 75 cm² Zellkulturflasche in ca. 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryogefäß gegeben. Die Gefäße wurden in eine Kühlbox überführt, um die Zellen langsam auf -80°C abzukühlen.

Nach ca. einen Tag bei -80°C , wurden die Kryogefäße in einen Stickstofftank bei -196°C gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und zügig in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension (ca. 1 ml) wurde in 5 ml Fibroblastenmedium überführt und anschließend zentrifugiert (10 Minuten bei $300\times g$). Das Zellpellet wurde in das RPMI-basierte Versuchsmedium aufgenommen und auf zwei 75 cm^2 -Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.4 Isolierung von humanen Endothelzellen

Die verwendeten Endothelzellen stammen aus entfernten Varizen. Die Entfernung der Varizen erfolgte im Rahmen einer Venenstripping-Operation. Diese Operation wurde in der Gefäßchirurgie des Gefäßzentrums der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim durchgeführt und unterlag der Zustimmung der Ethikkommission Gießen. Die Patienten willigten schriftlich durch Einverständniserklärungen der weiteren Verwendung des entfernten Gewebes ein.

Das entfernte Gewebe wurde nach Entnahme in steriler Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gekühlt zur weiteren Bearbeitung sofort in das Labor transportiert. Zunächst wurde das Blutgefäß zweimal mit PBS gespült, um restliches Blut weitgehend zu entfernen. Es wurden gezielt Gefäßabschnitte ausgewählt, die möglichst keine oder wenige abgehenden Gefäße aufwiesen. Falls doch abgehende Blutgefäße vorlagen, wurden diese mit einer Operationsklemme verschlossen. Eines der Enden wurde ebenfalls verschlossen. Über das andere Ende wurde Kollagenase H in das Lumen des Gefäßes gegeben und dieses Gefäßende ebenfalls verschlossen. Durch diesen Vorgang lösen sich die EC von der kollagenreichen Basallamina.

Um den enzymatischen Abbauprozess zu unterstützen, wurde das Gefäß in einem Behälter mit sterilem PBS für ca. 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension unter sterilen Bedingung mit einer Pipette entnommen und in ein 15 ml-Reaktionsgefäß mit ca. 3 ml Fibroblastenmedium überführt. Das Blutgefäß wurde zusätzlich zweimal mit Fibroblastenmedium gespült, um eventuell noch adhärenzte Endothelzellen von der Basallamina zu lösen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (10 Minuten bei $300\times g$), das Zellpellet in 1 ml Endothelzellmedium resuspendiert und in ein Loch einer 12-Loch-Platte gegeben. Die Platte wurde zuvor mit Rattenschwanzkollagen beschichtet, um die Zelladhäsion zu begünstigen. Die Beschichtung mit der Rattenschwanzkollagenlösung erfolgte auf den jeweiligen Platten für ca. 45 Minuten bei RT unter sterilen Bedingungen.

2.2.5 Kultivierung der Endothelzellen

Die Kultur der Endothelzellen fand nach Isolation in einem Inkubator bei 37°C und 10% CO₂ statt. 24 Stunden nach der Isolation wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und erneut 1 ml Endothelzellmedium hinzugegeben. Im Verlauf wurde das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 100% wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und zur Ablösung mit 1x Trypsin/EDTA inkubiert. Nach Ablösung der Zellen wurde der Prozess mit Zugabe von Fibroblastenmedium beendet und die Zellsuspension zentrifugiert (10 Minuten bei 300xg). Das Zellpellet wurde in Endothelzellmedium (3 ml) aufgenommen und die Zellsuspension in eine mit Rattenschwanzkollagen-beschichtete 25 cm²-Zellkulturflasche gegeben. Die Zellen wurden auf diese Weise erneut bis zu einer Konfluenz von 100% kultiviert, abgelöst und in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt.

Die isolierten EC wurden in den verschiedenen Versuchen bis maximal Passage 3 verwendet, da sie bereits nach wenigen Passagen ihren Phänotyp ändern. Um die Reinheit der EC zu bestätigen, wurden EC in ein 8-Loch-Kammer-Objektträger gegeben und nach Adhäsion der Zellen anschließend mit einem Antikörper gegen humanes CD31 gefärbt. Hiermit wurde immunzytochemisch die Reinheit der EC bestätigt. Nur Kulturen mit 100% CD31-positiven Zellen und ohne fibroblastoide Zellen wurden für weitere Versuche verwendet.

2.2.6 Stimulierung von Fibroblasten bzw. Endothelzellen

Die RASF wurden nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% in Passage 6 (für statische und dynamische Adhäsionsassays) bzw. Passage 7 (für die molekulare Analyse der Adhäsionsmoleküle) stimuliert. Die Endothelzellen wurden in Passage 3 stimuliert. Die Stimulierung erfolgte für 17 Stunden in einer Konzentration der Adipokine und RA-Therapeutika, wie sie durchschnittlich in den Seren bzw. Synovialflüssigkeiten von Patienten mit RA vorgefunden wird (Dexamethason: Gossye et al. 2009; Resistin: Senolt et al. 2007, Otero et al. 2006; Visfatin: Meier et al. 2012, Brentano et al. 2007; Otero et al. 2006; Adiponektin: Choi et al. 2009, Otero et al. 2006; Prednisolon: Häupl et al. 2007, Bitensky et al. 1977).

Methotrexat wurde in zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt: Erstens in einer Konzentration, wie sie bei einer RA-Therapie im Serum vorliegt (MTX (RA): Bramlage et al. 2008, Tishler et al. 1989), und zweitens in einer Konzentration, wie sie bei einer Tumorthherapie – ebenfalls im Serum – gemessen werden kann (MTX (C): Lin et al. 2009, Glantz et al. 1998).

Stimulanz	Konzentration	
Adiponektin	10	µg/ml
Visfatin	100	ng/ml
Resistin	20	ng/ml
TNF-α	10	ng/ml
Dexamethason	0,516	µg/ml (1,0 µM)
Prednisolon	0,461	µg/ml (1,0 µM)
Methotrexat (RA-Therapie)	0,682	µg/ml (1,5 µM)
Methotrexat (C; Tumortherapie)	454,4	µg/ml (1000 µM)

Tabelle 11: Konzentration der Stimulanzen

2.2.7 RNA-Isolierung

Nach Erreichen der Passage 7 (RASf) bzw. Passage 2 (EC) wurden die Zellen auf 6-Loch-Platten verteilt. In diesem Format wurden die Zellen mit dem jeweiligen Medium bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit den ausgewählten Adipokinen und RA-Therapeutika für 17 Stunden stimuliert. Pro Stimulierungsansatz wurden jeweils zwei Wells der 6-Well-Platte verwendet, um die RNA-Ausbeute zu erhöhen.

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das Medium abgenommen und die Wells mit PBS gespült. Die RNA wurde mithilfe des RNeasy Midi Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll isoliert. Die RNA-Menge wurde photometrisch mittels NanoDrop® (peqlab) bestimmt und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.8 Nachweis der Genexpression

Die Bestimmung der Genexpression erfolgte mittels Reverse Transkriptase Polymerase (PCR). Dafür wurde zunächst die RNA isoliert. Hierfür wurde das RNeasy Midi Kit von Qiagen verwendet und das Herstellerprotokoll befolgt. Um die Kontamination durch genomische DNA zu reduzieren, wurde zusätzlich DNase eingesetzt, um genomische DNA-Reste zu degradieren. Mithilfe der reversen Transkription wurde die RNA-Probe in cDNA umgeschrieben.

Pro RNA-Probe wurde folgender Mix angesetzt:

	Pro 25 µl-Ansatz	Pro 50 µl-Ansatz
AMV Puffer (5x)	5,0 µl	10,0 µl
dNTP-Mix	2,5 µl (10 mM)	5,0 µl (10 mM)
Hexamer-Primer	0,5 µl (2 µg/µl)	1,0 µl (2 µg/µl)
RNase Inhibitor	0,5 µl (40 U/µl)	1,0 µl (40 U/µl)
AMV-Polymerase	2,0 µl (10 U/µl)	2,0 µl (10 U/µl)
RNA-Probe	X µl	X µl
H₂O	X µl	X µl

Die Menge des Ansatzes war abhängig von der Konzentration der RNA. Für die Reverse Transkription wurde im Thermocycler folgendes Programm genutzt:

72°C	2 Minuten	Hitzedenaturierung, dann Kälteschock im Eiswasser
25°C	10 Minuten	
37°C	30 Minuten	
42°C	30 Minuten	
70°C	10 Minuten	

Die cDNA wurde im Anschluss bei -20°C für die weiteren Versuche gelagert.

Mithilfe einer PCR wurden die cDNA-Abschnitte amplifiziert. Dafür wird die cDNA zunächst erhitzt, wodurch es zur Denaturierung kommt. Der Doppelstrang teilt sich und zwei Oligonukleotide, sogenannte Primer, können an spezifische Abschnitte der Stränge binden. Diese Primer grenzen an die zu amplifizierende Gensequenz an. Eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) verlängert daraufhin die Primerabschnitte durch Inkorporation von freien Nukleotiden.

Der Vorgang der Kettenreaktion findet in einem Thermocycler statt, welcher spezifische Programme für die Kettenreaktion beinhaltet und aus Denaturierung, Hybridisierung (Anlagerung) der Primer und Polymerisation (Elongation) besteht. Nach jedem Zyklus verdoppelt sich die DNA-Menge. Für die PCR-Reaktion wurde folgendes Reaktionsgemisch genutzt:

Taq PCR Master Mix Kit	10 µl
DNA-Probe	2,0 µl
Primer-Mix (je 0,5 µM for/rev)	1,0 µl
ddH ₂ O	7,0 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Für die Durchführung der PCR wurde im Thermocycler folgendes Programm verwendet:

Beginn Denaturierung	5 Minuten	94°C	
Denaturierung	30 Sekunden	94°C	} 30 Zyklen
Primerhybridisierung	1 Minute	60 oder 62°C	
Elongation	1 Minute	72°C	
Finale Elongation	10 Minuten	72°C	
Kühlung	∞	4°C	

2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

In Anschluss an die Reverse Transkriptase - PCR wurde die spezifische Amplifizierung des gewünschten Genabschnitts mittels Gelelektrophorese in einem 1,5%igen Agarose-Gel in 1x TAE-Puffer geprüft. Dafür wurden 10 µl der Probe mit 2 µl 6-fach Ladepuffer versetzt. Das Gemisch wurde in dafür vorbereitete Taschen des Gels gegeben. Für den Größenvergleich der DNA-Banden wurde ein 100 bp DNA-Leiter benutzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V Spannung für ca. eine Stunde. Nach Durchlaufen des Gels wurden die Banden mittels 20 Minuten Inkubation im Ethidiumbromidbad [1 µg/ml] nachgewiesen. Die DNA-Banden im Gel wurden mittels UV-Licht dargestellt und fotografiert.

2.2.10 Real-time PCR

Um die Expression der Adhäsionsmoleküle quantitativ zu erfassen, wurde die Real-time PCR genutzt. Die Versuche wurden in einem LightCycler® (Roche) unter Verwendung des SYBR Green Master Mixes durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität von SYBR Green verstärkt sich, sobald es in neu gebildete DNA eingebunden wird. Die Bindung an die DNA erfolgt hierbei unabhängig von der Gensequenz.

Nach jeder Elongationsphase wird die Fluoreszenzintensität in den Kapillaren gemessen. Diese steigt von Zyklus zu Zyklus mit zunehmender Menge an DNA an, bis eine Plateauphase erreicht wird. Die Messungen wurden mit den Ergebnissen des Referenzgens 18S rRNA normalisiert.

18S rRNA ist eine ubiquitäre ribosomale RNA, die eine gleichmäßige Expression in Zellen aufweist. Das Primer-Paar für die Amplifikation der 18S rRNA wurde so entworfen, dass es ein breites Temperaturoptimum für die effiziente Primerbindung besitzt und daher bei allen PCR-Läufen unter verschiedenen Primer-Hybridisierungstemperaturen parallel mitgeführt werden kann. Dabei wurde festgelegt, dass Werte ab einer 2-fachen Erhöhung bzw. -2-fachen Reduktion als potentielle Änderungen angesehen wurden.

Jede Kapillare wurde mit 20 µl des Real-time-PCR-Mix wie folgt beladen:

SYBR Green MM	10 µl
Primer-Mix (forward und reverse)	1,0 µl (Endkonzentration: 0,5 µM)
MgCl ₂	X µl (3,0 – 4,5 mM)
cDNA-Probe	2,0 µl
ddH ₂ O	X µl (abhängig von MgCl ₂ -Menge)
Gesamtvolumen	20 µl

Nachdem der LightCycler® mit den Proben beladen wurde, wurde folgendes Programm für die Durchführung der Real-time-PCR genutzt:

Beginn	95 °C	15 Minuten	Beginn der Denaturierung
Zyklus (35 – 55x)	95 °C	15 Sekunden	Denaturierung
	X °C	25 Sekunden	Primerhybridisierung
	72 °C	30 Sekunden	Elongation/Messung der Fluoreszenz
Schmelzkurve	50 – 99 °C	0,1 °C/Sekunde	
Ende	40 °C		Kühlung

2.2.11 Optimierung der Primer für die Real-time PCR

Vor Durchführung der Quantifizierung wurde die Spezifität der Primer anhand einer Schmelzkurvenanalyse geprüft. Die Schmelzkurven stellen graphisch die Denaturierung des Doppelstrangs im Verhältnis zur steigenden Temperatur von 50°C auf 90°C dar. Abhängig von den Schmelztemperaturen der gebildeten Produkte sollte bei optimaler Amplifikation in den transformierten Schmelzkurven bei einer spezifischen Reaktion nur ein einzelner „Peak“ sichtbar sein. Sind mehrere „Peaks“ zu sehen, erfolgte eine unspezifische Reaktion und eine zuverlässige Quantifizierung ist in diesem Fall nicht möglich. Die Optimierung der Real-time PCR ist unabdingbar für eine valide Quantifizierung. Dies kann durch die Anpassung der Hybridisierungstemperatur und der Magnesiumchloridkonzentration für das jeweilige Primer-Paar erreicht werden. Zuerst werden die Bedingungen für die Primer mittels Standard-PCR in Bezug auf Temperatur und Magnesiumchloridkonzentration voroptimiert. Anschließend wird die Effizienz im LightCycler® anhand einer Verdünnungsreihe der cDNA (1:5, 1:15, 1:45, 1:135) und unterschiedlichen Konzentrationen von Magnesiumchlorid (3,0 mM, 3,5 mM, 4,0 mM, 4,5 mM) überprüft. Die Software des LightCyclers® errechnet daraus eine Steigung (Slope). Die Amplifikationseffizienz der PCR wird daraufhin mit folgender Formel bestimmt: $E=10^{(-1/slope)}$. Das Ergebnis sollte bei $2.00 \pm 0,05$ liegen, um zu gewährleisten, dass die Näherungsformel

($2^{-\Delta\Delta Ct}$) zur Berechnung der x-fachen Änderungen der Genexpression mit ausreichender Genauigkeit angewendet werden kann.

2.2.12 Statischer Adhäsionsassay (Zell-Zell-Bindungsassay)

Für die Analyse der Interaktion zwischen Fibroblasten und Endothelzellen wurde ein Zell-Zell-Bindungsassay verwendet. Hierfür wurden beide Zellsorten zunächst getrennt voneinander kultiviert. Die RASF wurden beim Übergang in die Passage 6 auf 12-Well-Platten verteilt. In diesem Format wurden sie bis zur Konfluenz von ca. 90% kultiviert. Zeitgleich wurden die EC beim Übergang in die Passage 3 auf 48-Loch-Platten verteilt. Diese Platten wurden vorher mit Rattenschwanzkollagen beschichtet. Für den Versuch wurde bei den EC eine Konfluenz von 100% benötigt.

Die RASF wurden mit Adiponektin, Visfatin, Resistin, TNF- α , Dexamethason, Prednisolon bzw. Methotrexat 17 Stunden lang stimuliert. Als Kontrolle dienten nicht stimulierte RASF. Jeweils drei Wells der 12-Loch-Platte wurden als experimentelle Replikate für die jeweilige Stimulierung und die Kontrolle genutzt. Nach Ablauf der Stimulierungszeit wurde das Stimulierungsmedium entfernt, die RASF mit PBS gewaschen und mit Calcein-AM gefärbt. Dabei handelt es sich um eine per se nicht-fluoreszierende Substanz, die sich in lebenden Zellen anreichert. Das Calcein-AM wird in der Zelle durch eine Esterase in das stark fluoreszierende Calcein und einen Acetoxymethylester-Rest gespalten.

Das Calcein ist im Zytoplasma bei Licht einer Wellenlänge von 495 nm sichtbar, so dass sich vitale RASF im Fluoreszenzmikroskop als grün fluoreszierende Zellen darstellen. Das Calcein-AM wurde in serumfreiem Medium verdünnt (2 μ l Calcein-AM-Lösung auf 1 ml serumfreies Medium) und für 45 Minuten bei 37°C mit den RASF inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen und überschüssige Färbelösung zu entfernen. Anschließend wurden die adhärenenten Zellen mit Accutase abgelöst und für 10 Minuten bei 300x g zentrifugiert. Das Lösen der adhärenierenden Zellen erfolgte durch Accutase, um die Intaktheit der Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche zu erhalten. Das Zellpellet wurde in einer definierten Volumenge aufgenommen und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die EC wurden parallel zu den Fibroblasten für 17 Stunden mit TNF- α stimuliert, um die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den aktivierten EC zu induzieren. Sie wurden ebenfalls nach der Stimulierung zweimal mit PBS gewaschen. Eine definierte Zellzahl der RASF in 200 μ l Versuchsmedium wurde dann auf die konfluente EC-Schicht in den

48-Loch-Platten gegeben. Die definierte Zellzahl wurde bei jedem Versuch neu bestimmt, da sie von der Anzahl der kultivierten Zellen abhing. Sie betrug zwischen 4000-5000 Zellen/200 μ l.

Es wurden jeweils die stimulierten mit den nicht-stimulierten Zellen verglichen. Pro Stimulierungsansatz wurden 3 Löcher mit RASF versehen (n=3 technische Replikate pro Patient). Durch das Verwenden von technischen Replikaten können z.B. Ungenauigkeiten beim Pipettieren ausgeglichen werden. Anschließend wurden die Platten für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Beenden der Inkubationszeit wurde das Medium (erneut 200 μ l) in den Löchern gewechselt und die Platten für 5 Minuten bei maximaler Frequenz auf einen Schüttler gesetzt. Danach wurde das Medium erneut gewechselt.

Der Vorgang des Schüttelns und des Wechsels des Mediums wiederholte sich insgesamt zweimal. Nach Zugabe von frischem Medium wurde die Zahl der adhären Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie analysiert und das Ergebnis mit der nicht stimulierten Kontrolle verglichen. Von jedem Loch wurden für die Bestimmung der Zellzahl fünf repräsentative Bereiche fotografiert. Aus diesen 5 Bereichen wurde pro Loch der Mittelwert ermittelt. Dieses Prozedere wurde für verschiedene Patienten mit mindestens drei biologischen Replikaten pro Stimulierung wiederholt, in die Statistik floss der Mittelwert aller experimentellen Replikate eines Patienten ein.

2.2.13 Dynamischer Adhäsionsassay (Flussskammerversuch)

Da unter physiologischen Bedingungen im Gefäßsystem dynamische Bedingungen vorherrschen, erfolgte, zusätzlich zur Untersuchung der statischen Adhäsion, die Untersuchung der Interaktion zwischen RASF und EC unter Flussbedingungen. Dafür wurden Kapillarobjektträger genutzt, die zunächst mit E-Selectin beschichtet wurden. Dafür wurde das lyophilisierte rhE-Selectin/Fc Chimera in PBS gelöst. Diese Stammlösung mit der Konzentration von 1mg/ml wurde anschließend 1:20 mit PBS verdünnt. Als Negativkontrolle diente die Beschichtung der Kapillaren mit FCS. Die Kanäle der Kapillarobjektträger wurden mit den jeweiligen Lösungen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Das weitere Material für den Flussversuch, wie Spritzen und Kunststoffschläuche, wurden für eine Stunde mit zellfreiem Versuchsmedium vorinkubiert, um die Adhäsion der Zellen an die Wände der Materialien so gering wie möglich zu halten.

Die RASF wurden für den Versuch bis zu einer Konfluenz von 90% in Passage 6 kultiviert und nach dem Erreichen der Konfluenz für 17 Stunden mit den bereits genannten Stimulanzen stimuliert. Pro Stimulierungsansatz wurden insgesamt ca. $1,1 \times 10^6$ Zellen

stimuliert, um ca. $0,8 \times 10^6$ Zellen/ml Versuchsmedium im Flussversuch einsetzen zu können. Als Kontrolle wurden nicht-stimulierte SF verwendet.

Nach der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Accutase abgelöst. Nach der Zentrifugation wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen daraufhin in Kulturmedium so resuspendiert, dass die oben genannte Zellkonzentration erreicht wurde. Die Zellsuspension wurde in eine 20 ml-Spritze aufgenommen, welche in die Spritzenpumpe (kd Scientific 100CE, Holliston, USA) eingesetzt (siehe Abb. 4) wurde. Über einen Kunststoffschlauch floss die Zellsuspension über den Kapillarobjektträger.

Drei verschiedene Flussgeschwindigkeiten wurden verwendet, die physiologisch, abhängig vom Gefäßdurchmesser, im menschlichen Körper vorkommen und einer Scherbelastung von 0.5 dyn/cm^2 , 0.9 dyn/cm^2 und 1.8 dyn/cm^2 entsprechen: 18,4 ml/h; 30,5 ml/h; 60,5 ml/h. Diese Bedingungen liegen in postkapillaren Venolen vor.

Für die Auswertung des Versuches wurde ein inverses Mikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Hamburg) genutzt. Mithilfe eines mit dem Mikroskop verbundenen Computers und des Programms „AviScreen Portable“ wurden Videoaufnahmen vom Computerbildschirm während des Flussversuches für jeweils 3x 1 Minute pro Versuchsansatz aufgenommen. Für die quantitative Auswertung der Zahl adhärenter Zellen wurden die Videosequenzen mit dem Programm „VLC Player“ verlangsamt und die Zahl der rollenden bzw. adhärierenden Zellen pro Sequenz bestimmt. Aus diesen 3x1-minütigen Ausschnitten (technische Replikate) wurde der Mittelwert pro Patient ermittelt.

Der Versuchsvorgang wurde für 3 verschiedene Patienten wiederholt.

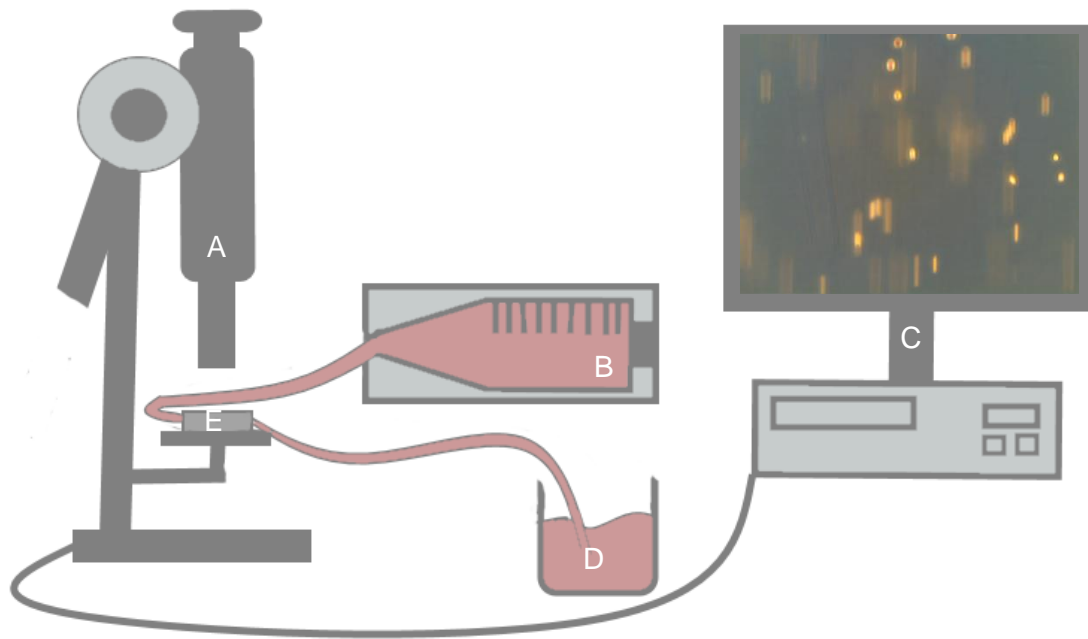


Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau des Flussversuches

Quelle: Eigene Darstellung

Das Mikroskop (A) ist auf die Kapillaren gerichtet. Die Geschwindigkeit des Flusses durch die Kapillaren wird über eine Spritzenpumpe (B) reguliert. In dieser befindet sich die Spritze, welche mit der Zellsuspension befüllt ist. Von der Spritze führt ein Schlauch zum Kapillar-Objektträger (E). Ein weiterer Schlauch führt zum Abfallgefäß (D). Die Auswertung des Versuchs erfolgt am PC (C), welcher mit dem Mikroskop verbunden ist.

2.3 Statistik

Für die statistische Analyse wurde der Student-t-Test genutzt. Die Auswertung erfolgte mithilfe von GraphPad Prism 5 und Microsoft Excel. Es wurde aus den experimentellen Replikaten der arithmetische Mittelwert pro Patient errechnet und für die statistische Auswertung eingesetzt. Anschließend erfolgte die Berechnung des Mittels und des Standardfehlers basierend auf den biologischen Replikaten sowie die statistische Analyse. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt:

$p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***)

3 Ergebnisse

3.1 Expression der Adhäsionsmoleküle nach Stimulierung der RASF

3.1.1 CD44

Die CD44-Expression konnte aufgrund der verschiedenen Splicingvarianten dieses Gens nicht mit einem einzelnen Primer-Paar analysiert werden. Aus diesem Grund wurden zwei Primer-Paare generiert, die die Mehrheit der Splicingvarianten einschlossen. Die Expression wurde mittels Real-Time-PCR untersucht. Das Primer-Paar CD44v5 beinhaltet alle Varianten außer der Splicingvariante 8 und das Primer-Paar CD44v8 beinhaltet alle Varianten außer die Variante 5.

Derzeit sind ca. 10 verschiedene Splicingvarianten von CD44 bekannt. Nach Stimulation mit den Adipokinen zeigte sich im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle keine Veränderung der CD44-Expression (keine mindestens 2-fache Regulation). Dies galt sowohl für die Verwendung des Primer-Paars CD44v5 als auch des Primer-Paars CD44v8 (siehe Abb. 5). Auch die Stimulation mit dem entzündungsfördernden Zytokin IL-1 β beeinflusste die Expression von CD44 in RASF nicht.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass die Verfügbarkeit primärer Zellen limitiert war, erfolgte keine weitere Analyse der CD44-Expression.

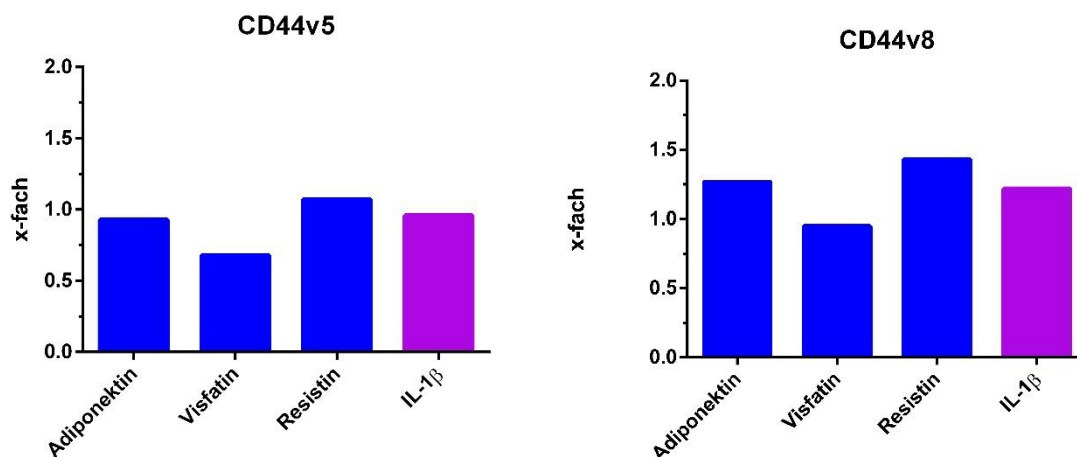


Abbildung 5: mRNA-Expression des Adhäsionsmoleküls CD44 (n=1) in RASF

Stimulation der RASF mit Adipokinen und IL-1 β , Expression von CD 44 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

3.1.2 Integrin $\alpha 2$

Die Stimulierung der RASF mit Adiponektin veränderte nicht die Expression von Integrin $\alpha 2$ im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Visfatin und Resistin wiesen tendenziell eine Erhöhung der Expression auf, diese war jedoch nicht signifikant.

Die Stimulierung mit TNF- α diene als positive Kontrolle, da TNF- α als proinflammatorisches Zytokin gilt und die Stimulation mit TNF- α zur vermehrten Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen führen kann.

TNF- α führte tendenziell zu einer stärkeren Erhöhung der Expression (siehe Abb. 6). Die Ergebnisse erreichten jedoch keine Signifikanz. Dexamethason zeigte kaum Einfluss auf die Expression. Die Stimulierung mit Prednisolon (15,5-fach), MTX (RA) (31,4-fach) und MTX (C) (26,69-fach) führten bei einzelnen Zellpopulationen zu einer starken Erhöhung von Integrin $\alpha 2$. Eine statistische Signifikanz der Ergebnisse konnte jedoch aufgrund der hohen individuellen Variabilität der Einzelergebnisse nicht erreicht werden (gepaarter t-Test: Prednisolon $p=0,3397$, MTX(RA) $p=0,1053$, MTX (C) $p=0,1466$). Insgesamt führte keine der Stimulierungen zu einem signifikanten Ergebnis.

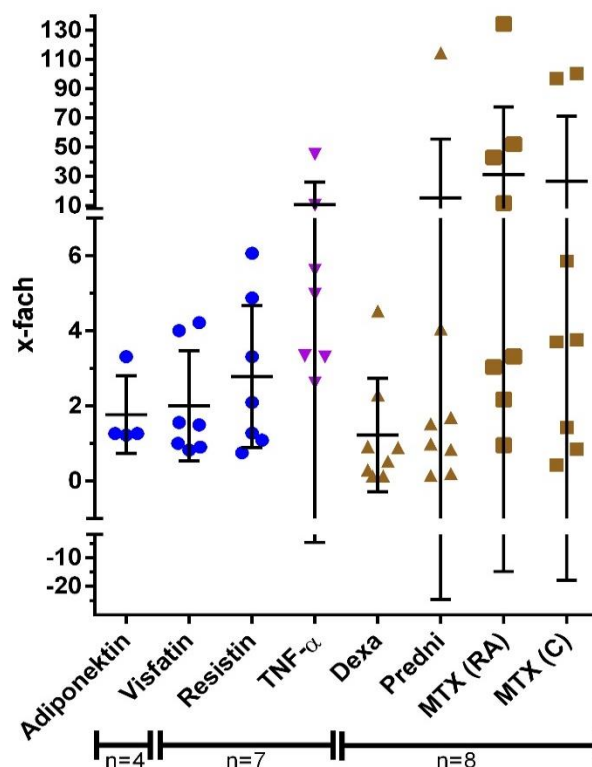


Abbildung 6: mRNA-Expression des Adhäsionsmoleküls Integrin $\alpha 2$ in RASF
Stimulation der RASF mit Adipokinen, TNF- α bzw. Basistherapeutika, Expression von Integrin $\alpha 2$ im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (gepaarter t-Test, Durchschnittswerte und Standardabweichungen).

3.1.3 Integrin $\alpha 4$

Die Expression von Integrin $\alpha 4$ wurde unter denselben Bedingungen wie bei Integrin $\alpha 2$ untersucht. Die Stimulierung mit den Adipokinen, TNF- α , Dexamethason, Prednisolon, MTX (RA) und MTX (C) (gepaarter t-Test: 1,94-fach; $p=0,0392$) zeigte keinen Einfluss auf die Expression von Integrin $\alpha 4$ (siehe Abb. 7).

Trotz der statistischen Signifikanz des Wertes für MTX(C) wurde das Ergebnis hier nicht als eine physiologisch relevante Änderung gewertet, da der Schwellenwert von 2 nicht erreicht wurde.

Zusammenfassend führten die Stimulierungen mit den ausgewählten Adipokinen und Basistherapeutika zu keiner physiologisch relevanten Expressionsänderung.

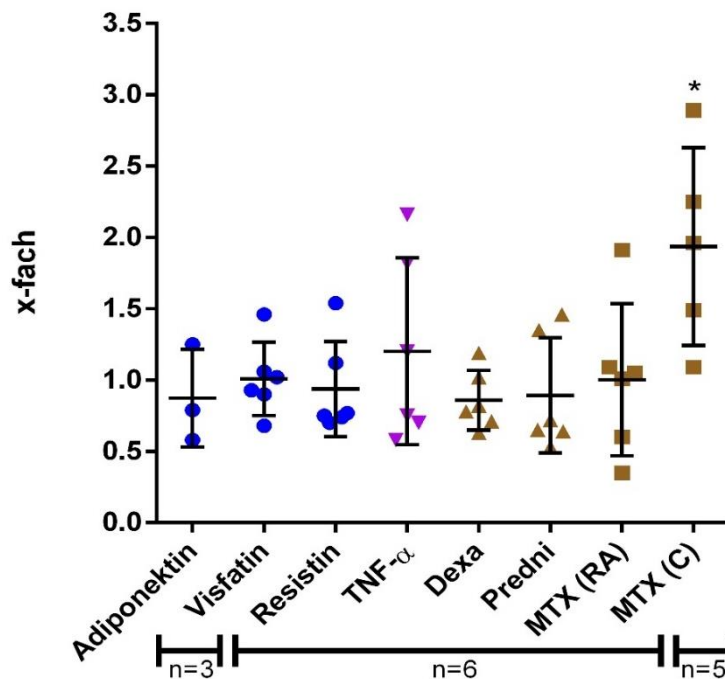


Abbildung 7: Expression des Adhäsionsmoleküls Integrin $\alpha 4$ in RASF
Stimulation der RASF mit Adipokinen, TNF- α bzw. Basistherapeutika, Expression von Integrin $\alpha 4$ im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (gepaarter t-Test, Durchschnittswerte und Standardabweichungen).

3.1.4 Integrin αv

Die Expression von Integrin αv war nach Stimulation mit Adiponektin, Visfatin und Resistin in RASF nicht verändert. Die Stimulierung mit Visfatin und Resistin führte zu signifikanten Ergebnissen, welche jedoch nicht physiologisch relevant waren.

TNF- α steigerte die Expression von Integrin αv signifikant (gepaarter t-Test: 2,85-fach; $p=0,0240$, siehe Abb. 8), ebenso Dexamethason (2,61-fach; $p=0,0183$). Prednisolon, MTX (RA) und MTX (C) führten zu keiner signifikanten Veränderung. Die eingesetzten Adipokine und die Basistherapeutika in Standard-RA-Dosierungen beeinflussten insgesamt die Expression von Integrin αv nicht. Die Stimulation mit TNF- α und Dexamethason führte jedoch zur signifikanten Steigerung der Expression um mindestens das 2-fache.

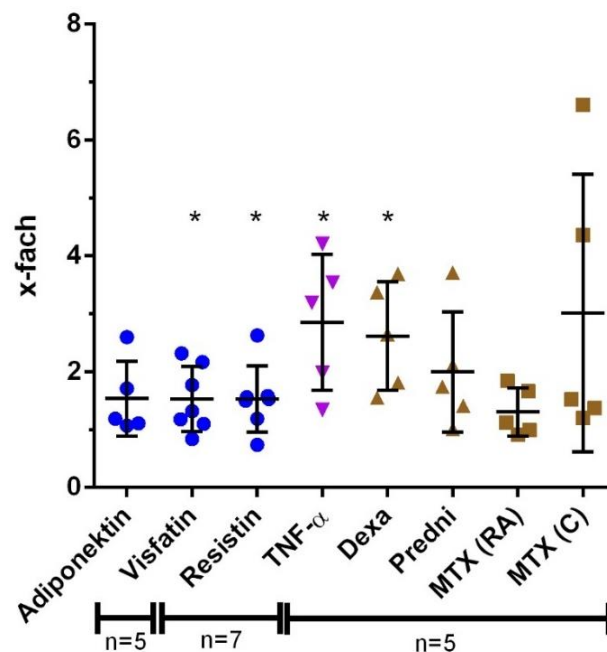


Abbildung 8: Expression des Adhäsionsmoleküls Integrin αv in RASF

Stimulation der RASF mit Adipokinen, TNF- α bzw. Basistherapeutika, Expression von Integrin αv im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (gepaarter t-Test, Durchschnittswerte und Standardabweichungen).

3.1.5 Integrin $\beta 1$

Adiponektin, Visfatin, Resistin, TNF- α , Dexamethason, Prednisolon, MTX (RA) und MTX (C) zeigten keinen Effekt auf die Expression von Integrin $\beta 1$ in RASF (s. Abb. 9). MTX (C) induzierte in einer einzelnen Zellpopulation überdurchschnittlich hoch die Expression von Integrin $\beta 1$. Betrachtet man die restlichen Zellpopulationen zeigt sich, dass durch MTX (C) keine Änderung der Expression erreicht wird. Zusammenfassend konnte keine veränderte Expression durch die Stimulierungen nachgewiesen werden. Durch die großen Variationen der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Zellpopulationen von unterschiedlichen Patienten wurden keine Signifikanzen erreicht.

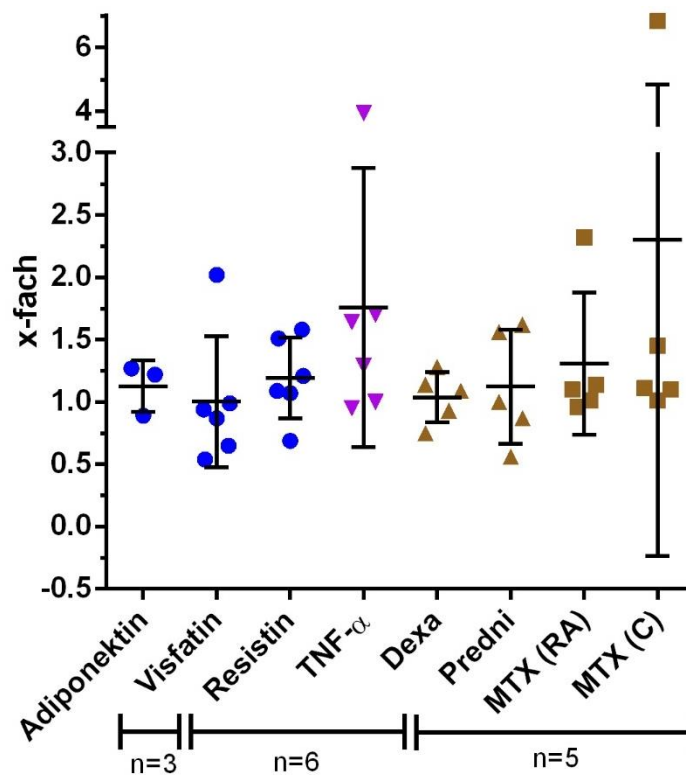


Abbildung 9: Expression des Adhäsionsmoleküls Integrin $\beta 1$ in RASF

Stimulation der RASF mit Adipokinen, TNF- α bzw. Basistherapeutika, Expression von Integrin $\beta 1$ im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (gepaarter t-Test, Durchschnittswerte und Standardabweichungen).

3.1.6 Integrin $\beta 5$

Die Stimulation mit den Adipokinen zeigte keinen Effekt auf die Expression des Adhäsionsmoleküls in RASF. Auch TNF- α , Dexamethason, Prednisolon, MTX (RA) und MTX (C) beeinflussten die Expression nicht (s. Abb. 10). Die Ergebnisse bei der Stimulierung mit Prednisolon, MTX (RA) und MTX (C) wiesen starke Streuungen auf. Jeweils eine Zellpopulation reagierte mit einer überdurchschnittlichen Induktion der Expression von Integrin $\beta 5$. Die restlichen Zellpopulationen (n=4) zeigten keine Änderung der mRNA-Expression. Zusammenfassend wurde die Expression von Integrin $\beta 5$ durch die eingesetzten Stimulanzien nicht beeinflusst. Vor allem die Ergebnisse nach Stimulation mit den Therapeutika variierten stark und erreichten daher keine statistische Signifikanz.

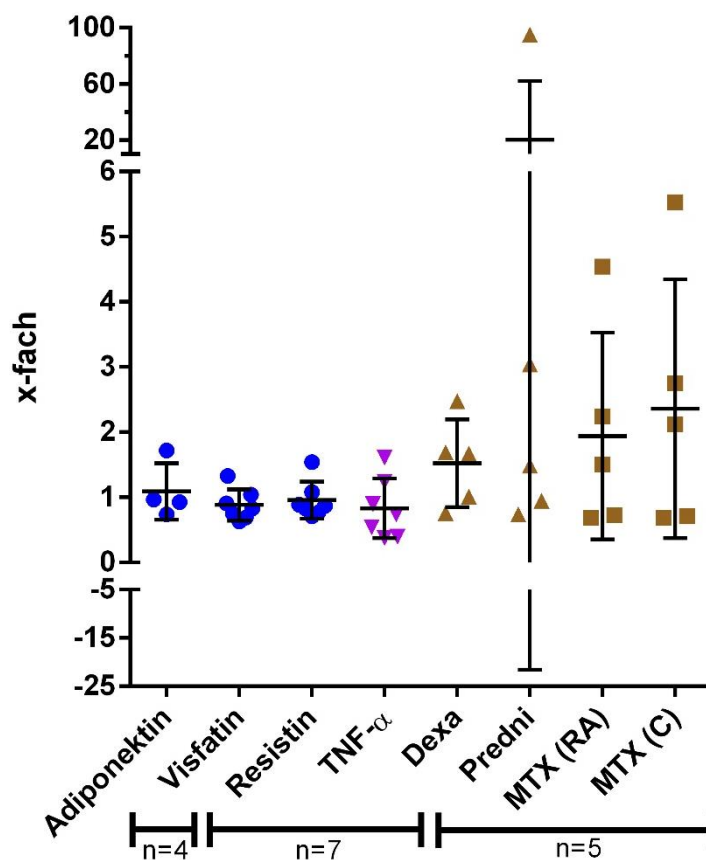


Abbildung 10: Expression des Adhäsionsmoleküls Integrin $\beta 5$ in RASF
 Stimulation der RASF mit Adipokinen, TNF- α bzw. Basistherapeutika, Expression von Integrin $\beta 5$ im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (gepaarter t-Test, Durchschnittswerte und Standardabweichungen).

3.1.7 Cadherin-11

Die Expression von Cadherin-11 war nach der Stimulation mit Adiponektin, Visfatin, Resistin, TNF- α , Dexamethason, Prednisolon, MTX (RA) und MTX (C) in RASF unverändert (s. Abb. 11). Durch die Stimulation mit MTX (C) wies v.a. eine Zellpopulation eine starke Induktion der Expression auf. Die übrigen Zellpopulationen zeigten keine Änderung der Expression nach Stimulierung mit MTX (C). Insgesamt führte weder die Stimulation mit den Adipokinen noch der Einsatz der Basismedikamente zu einer Veränderung der Expression von Cadherin-11. Die Ergebnisse waren nicht signifikant (gepaarter t-Test).

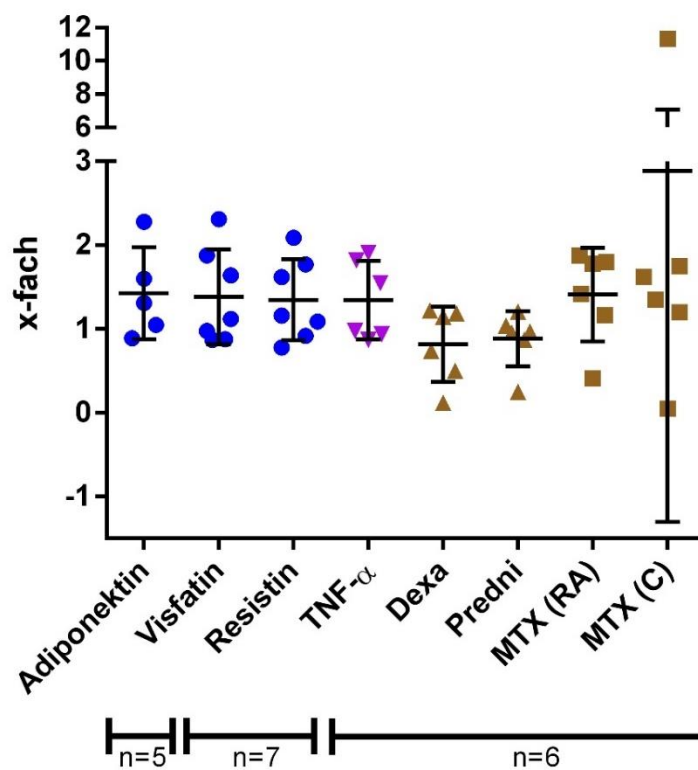


Abbildung 11: Expression des Adhäsionsmoleküls Cadherin-11 in RASF
 Stimulation der RASF mit Adipokinen, TNF- α bzw. Basistherapeutika, Expression von Cadherin-11 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (gepaarter t-Test, Durchschnittswerte und Standardabweichungen).

3.1.8 VCAM-1

Die Stimulation mit Adiponektin beeinflusste die Expression von VCAM-1 in RASF nicht (s. Abb. 12). Die Stimulierung mit Visfatin (gepaarter t-Test: 2,4-fach; $p=0,0272$, gepaarter t-Test) erreichte eine signifikante Steigerung der Expression. Die Stimulierung mit Resistin führte zu keiner signifikanten Expressionsänderung ($p=0,2262$, gepaarter t-Test). TNF- α wies tendenziell eine starke Steigerung der Expression auf (58,6-fach; $p=0,2151$, gepaarter t-Test), welche jedoch aufgrund der starken Streuung nicht signifikant war. Dagegen reduzierten Dexamethason (-6,48-fach; $p=0,0046$) und Prednisolon (-5,12-fach; $p=0,0053$) die Expression signifikant. Die Stimulierungen mit MTX (RA) und MTX (C) wiesen keinen Effekt auf die Expression von VCAM-1 in RASF auf.

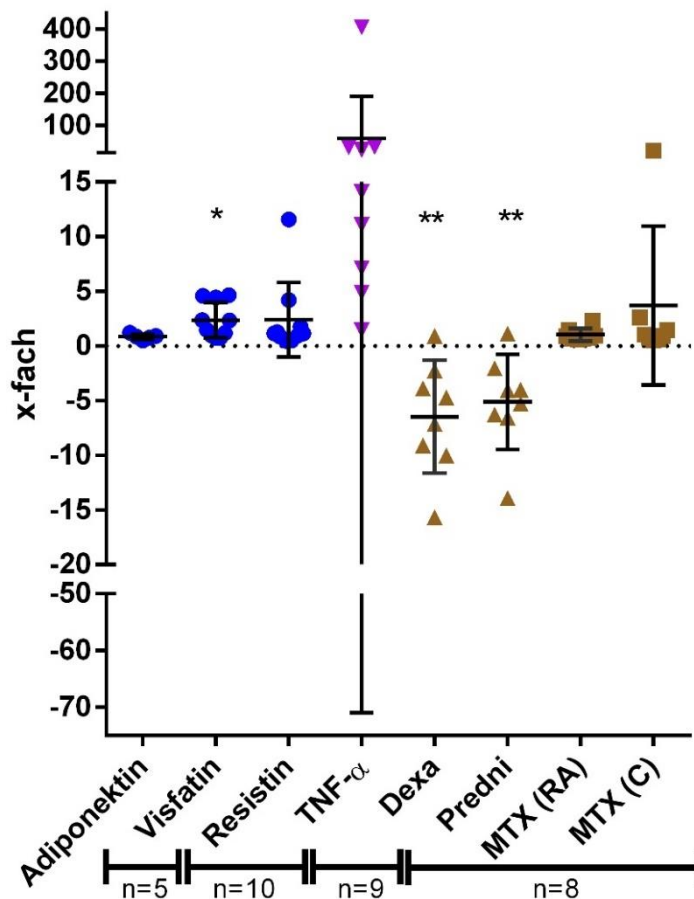


Abbildung 12: Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 in RASF

Stimulation der RASF mit Adipokinen, TNF- α bzw. Basistherapeutika, Expression von VCAM-1 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (gepaarter t-Test, Durchschnittswerte und Standardabweichungen).

3.1.9 ICAM-1

ICAM-1 zeigte keine veränderte Expression nach Stimulation mit Adiponektin, Visfatin und Resistin in RASF (s. Abb. 13). TNF- α führte bei einzelnen Zellpopulationen zu einer deutlich gesteigerten Expression im Median (41-fach; $p=0,099$), die jedoch in der Summe keine Signifikanz erreichte. Die Stimulierung mit Dexamethason, Prednisolon und MTX (RA) beeinflusste nicht die Expression von ICAM-1. Auch die Stimulierung mit MTX (C) führte zu keiner signifikanten Änderung der Expression (5,16-fache; $p=0,2207$). Dieses Ergebnis kam durch die starke Induktion einer Zellpopulation nach Stimulierung mit MTX (C) zustande. Die Stimulation mit den ausgewählten Adipokinen führte demnach zu keiner physiologisch relevanten Veränderung der Expression von ICAM-1. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch nach Stimulierung mit den rheumatologischen Basistherapeutika.

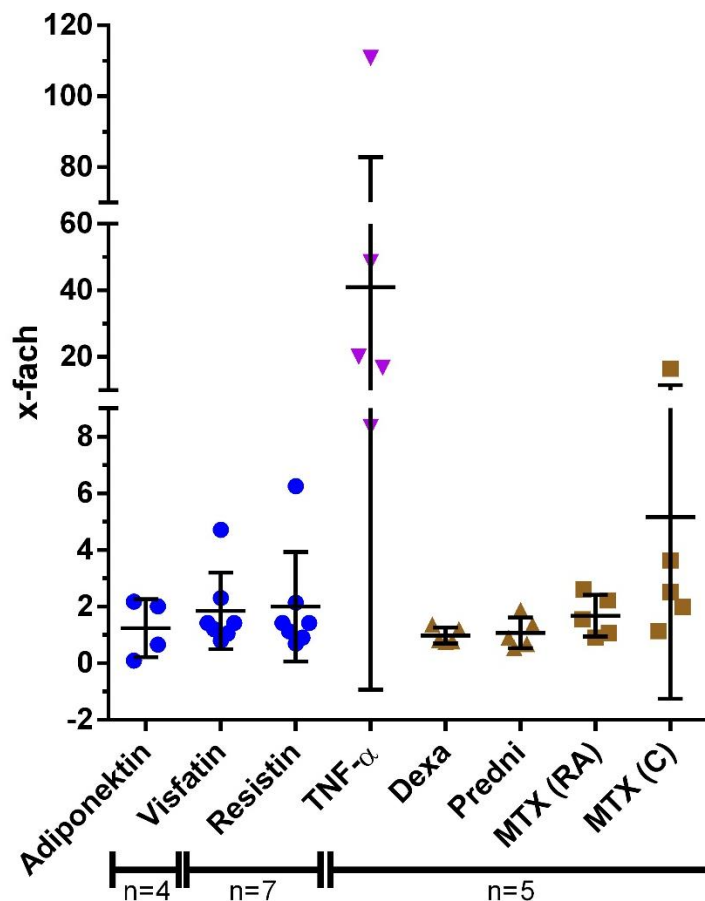


Abbildung 13: Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in RASF

Stimulation der RASF mit Adipokinen, TNF- α bzw. Basistherapeutika im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (gepaarter t-Test, Durchschnittswerte und Standardabweichungen).

3.2 Expression der Adhäsionsmoleküle nach Stimulierung der EC

3.2.1 VCAM-1

Adiponektin zeigte keine relevante Reduktion der Expression von VCAM-1 in Endothelzellen (s. Abb. 14). Auch Visfatin und Resistin beeinflussten die Expression nicht. TNF- α steigerte die Expression von VCAM-1 in einzelnen Populationen stark (gepaarter t-Test; 235-fach; $p=0,1232$). Es wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht. Dexamethason, Prednisolon, MTX (RA) und MTX (C) führten zu keiner Veränderung der Expression. Insgesamt konnte keine Expressionsänderung nach Stimulation mit den Adipokinen oder den therapeutisch wirksamen Substanzen nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich unter Stimulierung mit den Adipokinen eine starke Streuung der Ergebnisse.

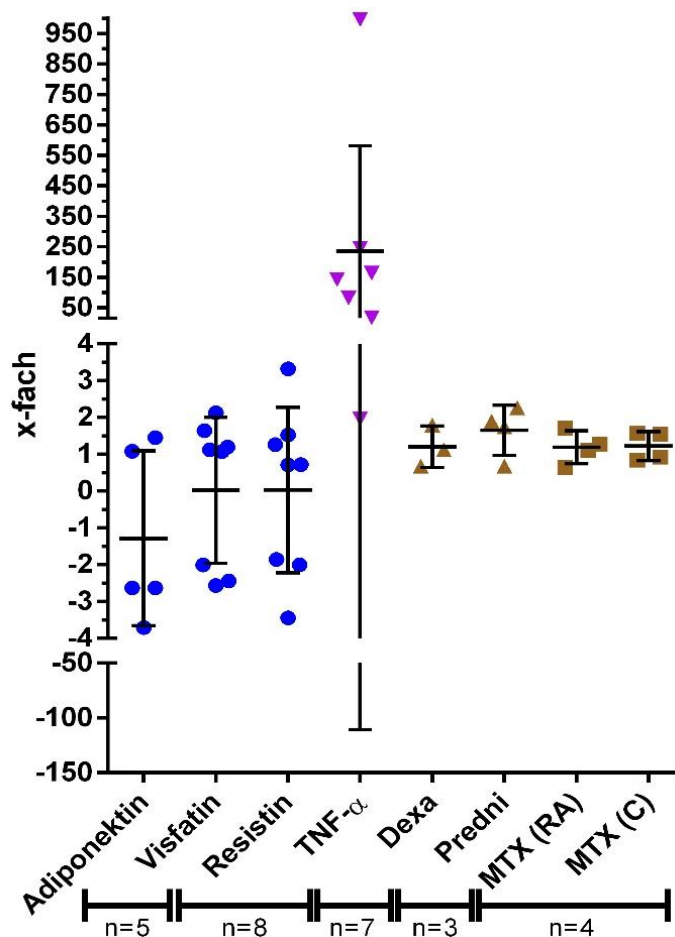


Abbildung 14: Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 in EC

Stimulation der EC mit Adipokinen, TNF- α bzw. Basistherapeutika im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (gepaarter t-Test, Durchschnittswerte und Standardabweichungen).

3.2.2 ICAM-1

Die Expression von ICAM-1 wurde durch die Stimulation mit Adiponektin in Endothelzellen signifikant reduziert (gepaarter t-Test; 2,27-fach; $p=0,0061$; s. Abb. 15). Visfatin und Resistin (gepaarter t-Test; $p=0,041$) führten zu keiner physiologisch relevanten Änderung. TNF- α steigerte die Expression signifikant um das 52,82-fache ($p=0,0048$). Dexamethason, Prednisolon, MTX (RA) und MTX (C) beeinflussten nicht die Expression von ICAM-1.

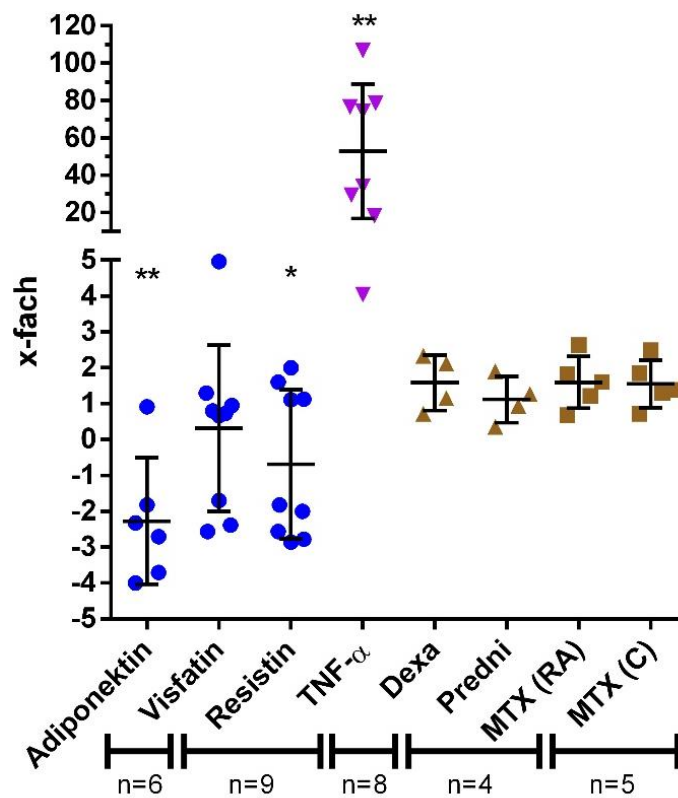


Abbildung 15: Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in EC

Stimulation der EC mit Adipokinen, TNF- α bzw. Basistherapeutika im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (gepaarter t-Test, Durchschnittswerte und Standardabweichungen).

3.2.3 P-Selectin

Die Stimulation mit den Adipokinen zeigte keinen Einfluss auf die Expression von P-Selectin in EC. TNF- α führte zu einer signifikanten Reduktion der Expression (gepaarter t-Test: -8,63-fach; $p=0,0122$; s. Abb. 16). Dexamethason, Prednisolon, MTX (RA) und MTX (C) beeinflusste die Expression von P-Selectin nicht.

Die Ergebnisse zeigten zusammenfassend, dass die Stimulation mit den ausgewählten Adipokinen und den Basistherapeutika keinen Effekt auf die Expression von P-Selectin hatten. Die Stimulation mit TNF- α führte dagegen zu einer eindeutigen und signifikanten Reduktion der Expression. Hierbei ist zu beachten, dass P-Selectin in Weibel-Palade-Körperchen gespeichert wird. Durch die Aktivierung des Endothels wird P-Selectin aus den Weibel-Palade-Körperchen an die Zelloberfläche transportiert. Somit ist für die Oberflächenexpression von P-Selectin keine direkte transkriptionelle Regulation notwendig. Die Neusynthese von P-Selectin kann jedoch beispielsweise durch IL-4 oder TNF- α auch induziert werden (Khew-Goodall et al. 1999).

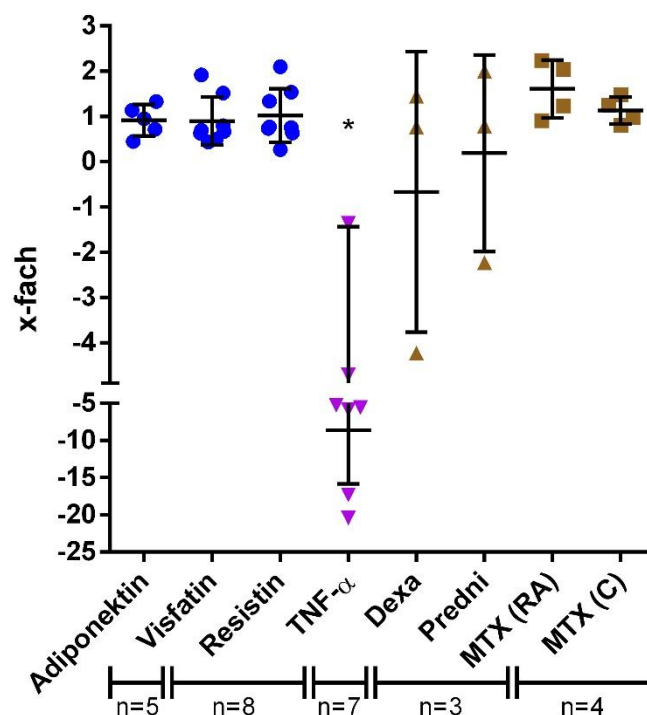


Abbildung 16: Expression des Adhäsionsmoleküls P-Selectin in EC

Stimulation der EC mit Adipokinen, TNF- α bzw. Basistherapeutika im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (gepaarter t-Test, Durchschnittswerte und Standardabweichungen).

3.3 Interaktion der RASF und EC im statischen Adhäsionsassay

(Zell-Zell-Bindungsassay)

Um den Einfluss der Adipokine auf die Interaktion zwischen RASF und EC zu untersuchen, erfolgte ein Zell-Zell-Bindungsassay (s. Abb. 17). Eine Interaktion zwischen RASF und EC konnte bereits nachgewiesen werden (Lefèvre et al. 2009; Neumann et al. 2010b). Der Einfluss der Adipokine auf die Interaktion wurde jedoch bislang nicht untersucht. Aus diesem Grund wurden RASF mit Adiponektin, Visfatin, Resistin, TNF- α , Dexamethason, Prednisolon und Methotrexat stimuliert. Zur Aktivierung der Adhäsionsmoleküle wurden die Endothelzellen mit TNF- α stimuliert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Interaktion beider Zellen unter statischen Bedingungen.

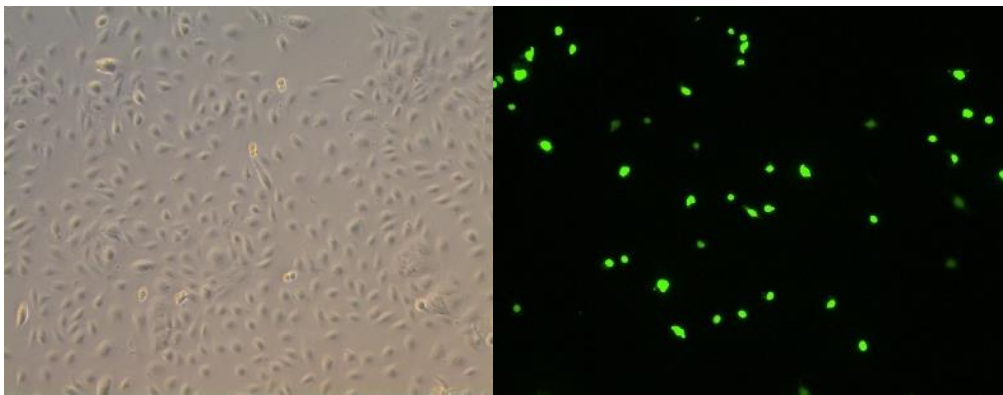


Abbildung 17: EC und RASF

EC lichtmikroskopisch (links); RASF mit Calcein-AM angefärbt, Darstellung mit Fluoreszenzmikroskop (rechts).

Die Stimulierung mit Adiponektin führte zu einer signifikanten Steigerung (gepaarter t-Test; $p=0,0126$, s. Abb. 18) der Adhäsion der RASF an die Endothelzellen um 37%, verglichen mit der nicht-stimulierten Kontrolle, ebenso wie auch Resistin (32%, $p=0,0494$), Visfatin (23%, $p=0,0415$) und TNF- α (38%; $p=0,0208$). Die Stimulation mit Dexamethason zeigte keinen Effekt. Prednisolon (-12%; $p=0,48$) und MTX (-7%; $p=0,68$) wiesen tendenziell eine Reduktion der Adhäsion auf, diese war jedoch nicht signifikant. Bei näherer Betrachtung der Werte zeigte sich, dass eine RASF-Population eine unerwartet hohe Adhäsion an EC nach Stimulation mit der Basismedikation aufwies. Dies konnte bei den restlichen RASF-Populationen nicht nachgewiesen werden. Aufgrund dessen erfolgte zusätzlich eine Analyse der Daten ohne diese RASF-Population. Die Auswertung der Daten ergab eine signifikante Reduktion der Adhäsion unter Einsatz von Prednisolon (-27%, $p=0,035$). Die Stimulierung mit MTX (RA) und MTX (C) erreichten keine statistische Signifikanz.

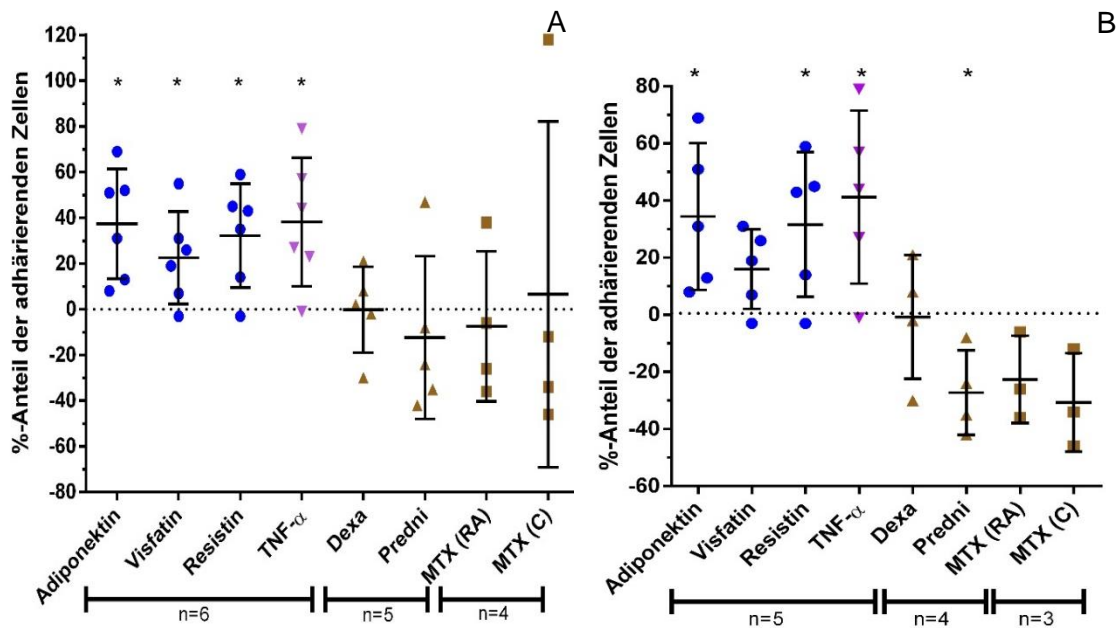


Abbildung 18: Zell-Zell-Bindungsassay

Anteil der adhärenen RASF an die Endothelzellen. Zuvor wurden die RASF mit Adipokinen, TNF- α bzw. Basistherapeutika stimuliert. Der Anteil der adhärenen RASF wurde mit den nicht-stimulierten RASF verglichen B: Analyse nach Ausschluss einer Population nach Stimulierung mit Adipokinen, TNF- α und Basistherapeutika (gepaarter t-Test, Durchschnittswerte und Standardabweichungen).

3.4 Interaktion der RASF mit E-Selectin im dynamischen Adhäsionsassay

Für die Untersuchung des Einflusses der Adipokine auf das Adhäsionsverhalten der RASF unter physiologischeren Bedingungen wurde ein Flusskammerversuch durchgeführt. In einem Vorversuch zeigten sich keine Veränderungen der Adhäsion nach Stimulierung mit Adiponektin, so dass aus wirtschaftlichen Gründen lediglich Visfatin und Resistin für diesen Versuch verwendet wurden.

Hierfür wurden drei verschiedene Flussgeschwindigkeiten verwendet (18,4 ml/h, 30,5 ml/h und 60,5 ml/h). Unter diesen Flussgeschwindigkeiten treten Scherspannungen von 0,5 dyn/cm², 0,9 dyn/cm² bzw. 1,8 dyn/cm² auf, welche in postkapillaren Venolen nachgewiesen wurden (Richter et al. 2011). Die Kapillaren wurden für den Versuch mit E-Selectin beschichtet. Die stärkste Adhäsion der unstimulierten RASF an die Kapillaren war bei 0,5 dyn/cm² (Scherspannung) bzw. 18,4 ml/h (Flussgeschwindigkeit) zu beobachten. Bei zunehmender Geschwindigkeit nahm die Adhäsion der RASF an die E-Selectin-beschichteten Kapillaren ab (s. Abb. 19).

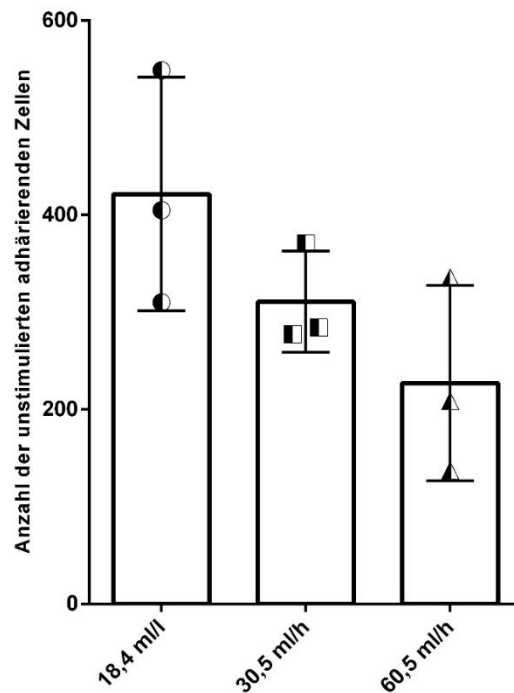


Abbildung 19: Flusskammerversuch (E-Sel-Beschichtung) bei unstimulierten RASF

Die adhärerende Zellzahl der unstimulierten RASF ($n=3$) an E-Selectin (Darstellung: Mittelwerte und Standardabweichungen).

Die Stimulierung mit Visfatin verstärkte im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle über alle drei Geschwindigkeiten hinweg die Adhäsion der RASF an E-Selectin (18,4 ml/h: 28%; 30,5 ml/h: 87% (gepaarter t-Test $p=0,0379$); 60,5 ml/h: 29%; s. Abb. 20), die jedoch nur bei mittlerer Geschwindigkeit ein signifikantes Ergebnis erreichte. Die Stimulierung mit Resistin führte zu keiner signifikanten Änderung der Adhäsion der RASF an E-Selectin (18,4 ml/h: -10%; 30,5 ml/h: 4%; 60,5 ml/h: 17%; s. Abb. 20), wie auch die Stimulierung mit TNF- α (s. Abb. 20). Tendenziell führte TNF- α bei niedriger und mittlerer Geschwindigkeit zur Steigerung der Adhäsion (18,4 ml/h: 17%; 30,5 ml/h: 40%; 60,5 ml/h: -16%; s. Abb. 20).

Dexamethason führte über alle Geschwindigkeiten hinweg tendenziell zu einer reduzierten Adhäsion (18,4 ml/h: -33%; 30,5 ml/h: -41%; 60,5 ml/h: -41%, s. Abb. 20), welche jedoch nicht signifikant war. Die Stimulierung mit Prednisolon führte zu keiner signifikanten Änderung der Adhäsion der RASF an E-Selectin (18,4 ml/h: -15%; 30,5 ml/h: 12%; 60,5 ml/h: -8%). Auch MTX (RA) (18,4 ml/h: -33%; 30,5 ml/h: 59%; 60,5 ml/h: -22%) und die Stimulierung mit MTX in erhöhter Konzentration (18,4 ml/h: 2%; 30,5 ml/h: 84%; 60,5 ml/h: 4%) beeinflussten die Adhäsion nicht signifikant.

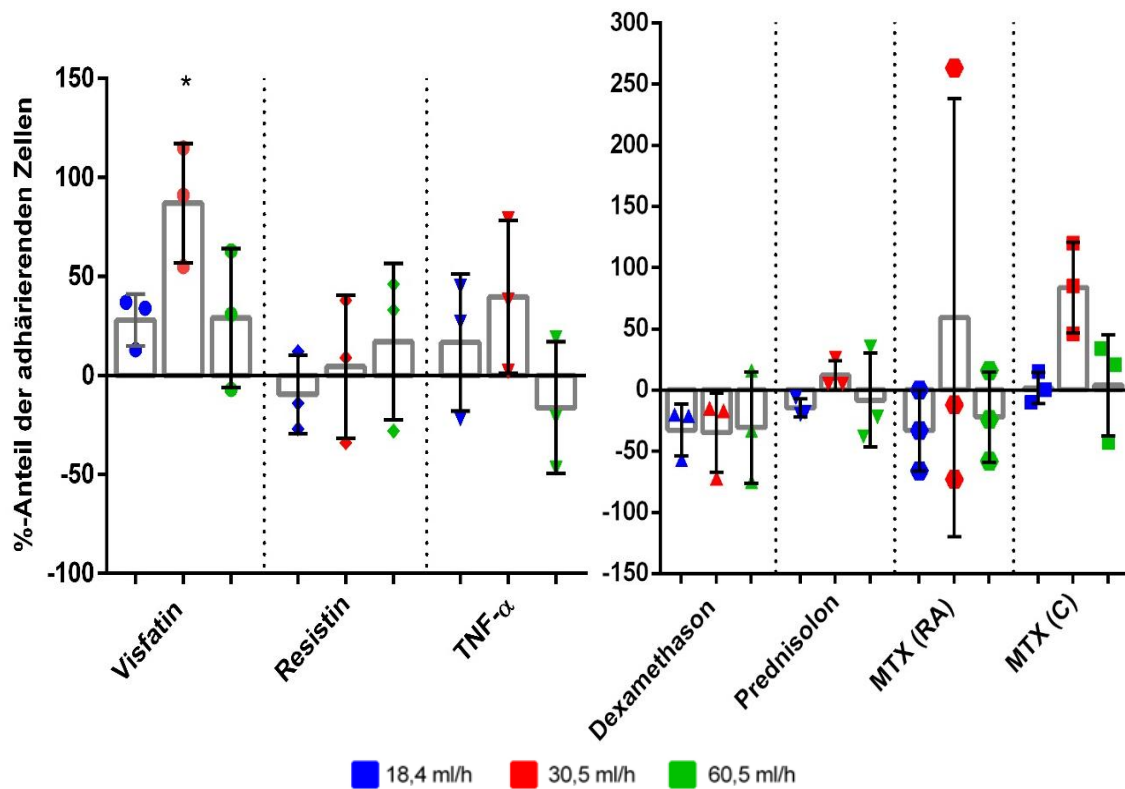


Abbildung 20: Flusskammerversuch (E-Sel-Beschichtung) bei stimulierten RASF

Der adhärenende Anteil der stimulierten RASF ($n=3$) an E-Selectin wurde mit der nicht-stimulierten Kontrolle verglichen.

Insgesamt zeigte sich im Flussversuch, dass Visfatin zu einer signifikant gesteigerten Adhäsion der RASF an E-Selectin bei mittlerer Geschwindigkeit führte. Im Vergleich dazu reduzierten die Basistherapeutika tendenziell die Adhäsion. Die Stimulation mit den Glukokortikoiden und Methotrexat führte jedoch bei einer überschaubaren Versuchszahl ($n=3$) zu keiner statistischen Signifikanz.

3.5 Interaktion der RASF und EC im dynamischen Adhäsionsassay

Da unter physiologischen Bedingungen das Endothel nicht nur E-Selectin als Adhäsionsmolekül aufweist, sondern viele verschiedene Adhäsionsmoleküle aufweist, wurden die Kapillaren im nächsten Flussversuch mit kommerziell erworbenen HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) beschichtet. Diese wurden ersatzweise für die primären Endothelzellen, aufgrund einer eingeschränkten Verfügbarkeit zum Zeitpunkt der Versuche, eingesetzt. In Vorversuche konnte gezeigt werden, dass die Interaktionsfähigkeit der primären EC und HUVECs mit RASF vergleichbar ist. Die RASF wurden für 17 Stunden mit den Adipokinen und den Basismedikamenten stimuliert. Die HUVECs wurden mit TNF- α ebenfalls für 17 Stunden stimuliert, um die Zellen zu aktivieren.

In der unstimulierten Kontrolle war ersichtlich, dass die RASF in der Lage sind, an HUVEC zu binden. Hierbei war die Anzahl adhärrierender Zellen bei den mittleren Scherkräften bzw. mittlerer Flussgeschwindigkeit am stärksten (s. Abb. 21).

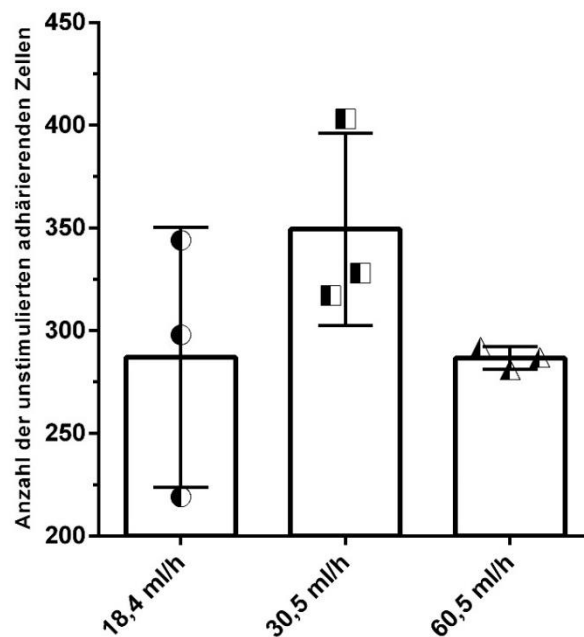


Abbildung 21: Flusskammerversuch (HUVEC) bei unstimulierten RASF

Die adhärrierende Zellzahl der unstimulierten RASF ($n=3$) an HUVEC (Darstellung: Mittelwerte und Standardabweichungen).

TNF- α , als entzündungsförderndes Molekül, durchweg zu einer erhöhten Adhäsion (18,4 ml/h: 61%; 30,5 ml/h: 18%; 60,5ml/h: 18%, s. Abb. 22) und erreichte bei mittlerer Geschwindigkeit ein signifikantes Ergebnis ($p=0,0460$, gepaarter t-Test). Die Stimulation mit Visfatin führte bei allen Geschwindigkeiten zu einer gesteigerten Adhäsion (18,4 ml/h: 156%, $p=0,0174$, gepaarter t-Test; 30,5 ml/h: 87%; 60,5 ml/h: 89%), die bei 18,4 ml/h statistisch signifikant war ($p=0,0174$). Die Stimulation mit Resistin führte zu keiner

signifikanten Änderung der Adhäsion der RASF an die EC (18,4 ml/h: 57% und 30,5 ml/h: 18%; 60,5 ml/h: -4%).

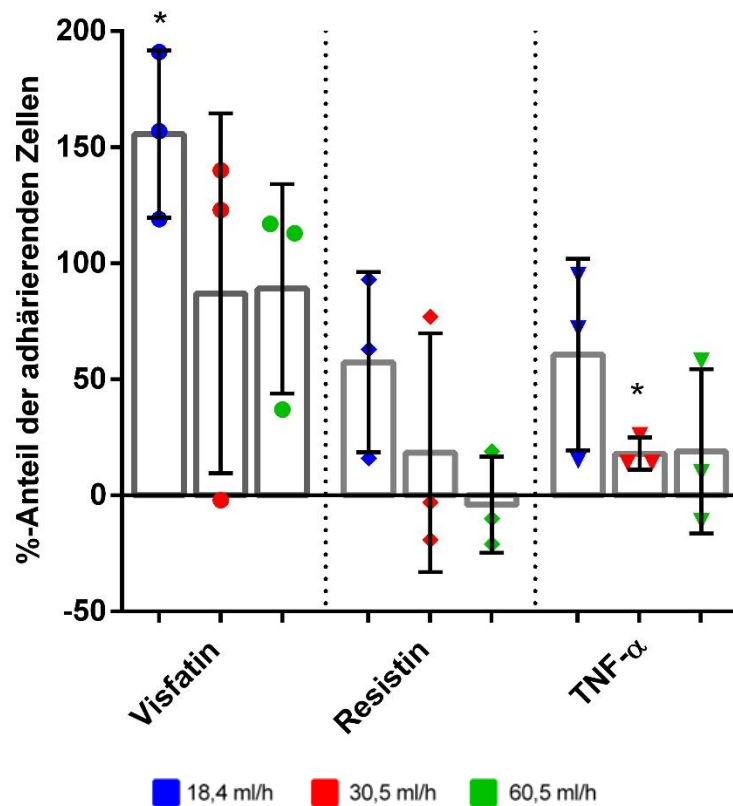


Abbildung 22: Flusskammerversuch (HUVEC) mit Adipokine

Der adhärenende Anteil der mit Adipokine und TNF- α stimulierten RASF ($n=3$) an HUVEC wurde mit der nicht-stimulierten Kontrolle verglichen (Darstellung der Einzel- und Mittelwerte und Standardabweichungen).

Im Gegensatz dazu reduzierte die Stimulation mit dem Glukokortikoid Dexamethason (s. Abb. 23) insgesamt die Adhäsion (18,4 ml/h: -9%; 30,5 ml/h: -39%; 60,5 ml/h: -53%). Bei 60,5 ml/h war die Reduktion statistisch signifikant ($p=0,0147$, gepaarter t-Test). Auch die Stimulierung mit dem Glukokortikoid Prednisolon erzielte ein ähnliches Ergebnis. Eine Reduktion der Adhäsion war unter allen Flussbedingungen zu beobachten (18,4 ml/h: -31%; 30,5 ml/h: -64%; 60,5 ml/h: -53%). Die reduzierten Adhäsion war bei der höchsten Geschwindigkeit statistisch signifikant ($p=0,0058$). MTX (RA) führte zu stark variierenden, nicht signifikanten Einzelergebnissen über alle Geschwindigkeiten hinweg (18,4 ml/h: 39%; 30,5 ml/h: 3%; 60,5 ml/h: -23%). MTX in erhöhter Konzentration reduzierte tendenziell über alle Geschwindigkeiten hinweg die Adhäsion (18,4 ml/h: -9%; 30,5 ml/h: -31%; 60,5 ml/h: -21%), die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant.

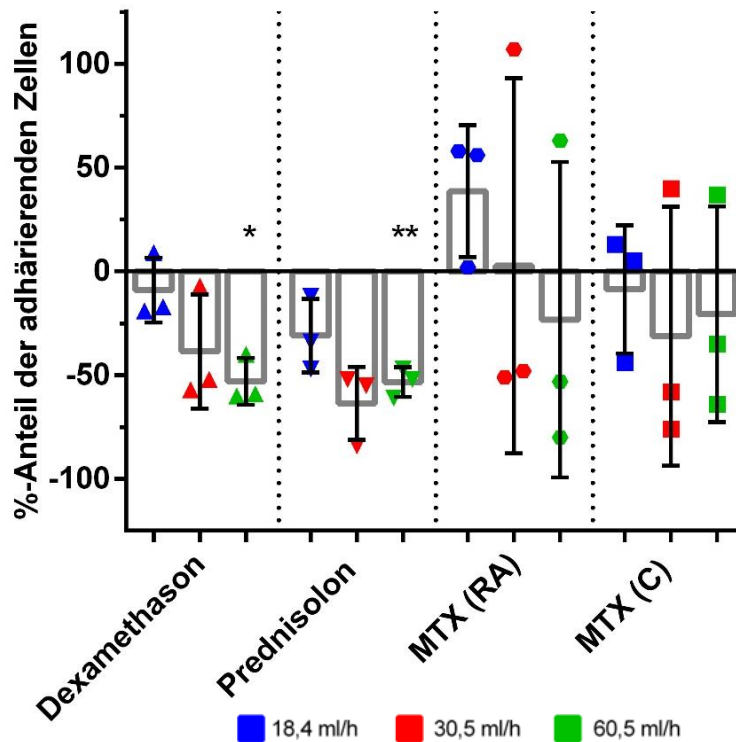


Abbildung 23: Flusskammerversuch (HUVEC) mit Therapeutika

Der adhärierende Anteil der stimulierten RASF ($n=3$) an HUVEC wurde mit der nicht-stimulierten Kontrolle verglichen (Darstellung der Einzel- und Mittelwerte und Standardabweichungen).

Zusammenfassend führte die Stimulation mit Visfatin bei niedriger und die Stimulation mit TNF- α bei mittlerer Geschwindigkeit zu einer signifikant gesteigerten Adhäsion der RASF an mit TNF- α aktivierten HUVECs, wohingegen die Stimulation mit den Glukokortikoiden bei hoher Flussgeschwindigkeit die Adhäsion signifikant reduzierte. Insgesamt war der Einfluss der Stimulanzen auf die Adhäsion unter Verwendung der TNF- α aktivierten HUVEC im Vergleich zu den E-Selectin-beschichteten Kapillaren stärker.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss ausgewählter Adipokine und Basistherapeutika auf die Interaktion zwischen RASF und Endothelzellen untersucht. Ziel war es, den Einfluss der Stimulation auf der Ebene der Genexpression sowie unter statischen und dynamischen Zellkulturbedingungen zu analysieren.

Die Interaktion beider Zelltypen spielt vermutlich während der Migration der RASF über Gewebegrenzen hinaus eine wichtige Rolle und kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden (Lefèvre et al. 2009; Neumann et al. 2010a; Schönfeld et al. 2015).

Verschiedene Adhäsionsmoleküle erlauben es den RASF an die Knorpelmatrix zu adhären, dort zu verbleiben und sie nachfolgend zu degradieren (Lefèvre et al. 2009; Schönfeld et al. 2015; Neumann et al. 2010b). Aufgrund der bisherigen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe und der wissenschaftlichen Daten bezüglich der Rolle der Adipokine im Kontext von chronischen Entzündungen, lag der Schwerpunkt dieser Promotionsarbeit auf der Untersuchung des Einflusses der Adipokine. Dass die Adipokine eine Rolle bei der RA spielen, wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt (Meier et al. 2012; Abella et al. 2014; Bokarewa et al. 2005; Chen et al. 2013; Kim et al. 2014; Schäffler et al. 2003; Otero et al. 2006; Frommer et al. 2012b; Frommer et al. 2010; Ehling et al. 2006; Eisinger et al. 2012). Insgesamt konnte eine erhöhte Konzentration verschiedener Adipokine in Patienten mit RA nachgewiesen werden. Dies lässt durchaus einen Einfluss der Adipokine im Zuge der Migration und Adhäsion der SF vermuten.

Für die Untersuchung der Interaktion beider Zellen wurde zunächst die Expression ausgewählter Adhäsionsmoleküle nach Stimulation mit den Adipokinen und den Basistherapeutika analysiert. Der Einfluss der Adipokine auf die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Dabei scheint Visfatin die VCAM-1-Expression in RASF zu induzieren (Abb. 12). Diese vermehrte Expression kann mit einer Zunahme der Adhäsion einhergehen. Die vermehrte Adhäsion wiederum kann das Krankheitsgeschehen begünstigen, so dass Visfatin als proinflammatorisches Adipokin gewertet werden kann. Auch die aktuellen wissenschaftliche Daten weisen auf eine proinflammatorische Rolle von Visfatin im Rahmen der RA hin (Moschen et al. 2007; Proccaccini et al. 2013; Brentano et al. 2007). Im Gegensatz dazu wirkt Adiponektin sowohl proinflammatorisch (Frommer et al. 2010; Tong et al. 2011) als auch protektiv. In Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen zeigt sich ein protektiver Effekt von Adiponektin (Ouchi et al. 2001; Arita et al. 2012).

Eine mögliche proinflammatorische Rolle der Adipokine war auch in den statischen Adhäsionsassays zu beobachten (s. Abb. 18). Hier verstärkte die Stimulation mit den Adipokinen die Adhäsion der RASF an EC.

Im dynamischen Adhäsionsassay zeigte sich eine signifikant erhöhte Adhäsion der RASF vor allem bei der niedrigeren (s. Abb. 22) und mittlerer Flussgeschwindigkeit (s. Abb. 20) nach Stimulierung mit Visfatin. Diese Ergebnisse untermauern die Daten aktueller wissenschaftlicher Arbeiten, die zeigen, dass die Visfatinkonzentration im Serum mit dem Grad der Krankheitsaktivität korreliert (Rho et al. 2009; Brentano et al. 2007; Meier et al. 2012). Vermutlich verstärkt Visfatin das Krankheitsgeschehen im Rahmen der RA (Brentano et al. 2007). Eine mögliche Korrelation der Krankheitsaktivität mit dem Visfatinspiegel konnte radiographisch, laborchemisch (CRP) und im DAS 28 nachgewiesen werden (Brentano et al. 2007; Meier et al. 2012; Rho et al. 2009).

4.1 Expressionsanalyse der Adhäsionsmoleküle

Die Rolle der RASF hinsichtlich ihres Beitrags zur Aktivität der RA konnte bereits in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden (Lefèvre et al. 2009; Pap et al. 2000). Hierbei spielt die Zell-Zell- und die Zell-Matrix-Adhäsion eine wichtige Rolle.

4.1.1 P-Selectin, E-Selectin und CD44 im Rahmen des „Rollens“

In der RA wird eine vermehrte Angiogenese durch eine Dysbalance von pro- und anti-angiogenen Faktoren begünstigt. Zudem wird das Endothel aufgrund des entzündlichen Milieus aktiviert (Fearon et al. 2003; Lee und Weinblatt 2001). Dies führt zu einer Aktivierung von Adhäsionsmolekülen (Doré und Sirois 1996; Szekanecz et al. 2010).

Wie bereits in der Einleitung dargestellt (s. Abb. 3), resultiert der entzündliche Vorgang in eine veränderte Hämodynamik, die mit einer reduzierten Flussgeschwindigkeit einhergeht. Dadurch können die RASF mit den Selectinen (hier E- und P-Selectin, s. Abb. 24) der EC, die wie Anker wirken, intensiver in Kontakt treten. Dies reduziert die Flussgeschwindigkeit der RASF zusätzlich.

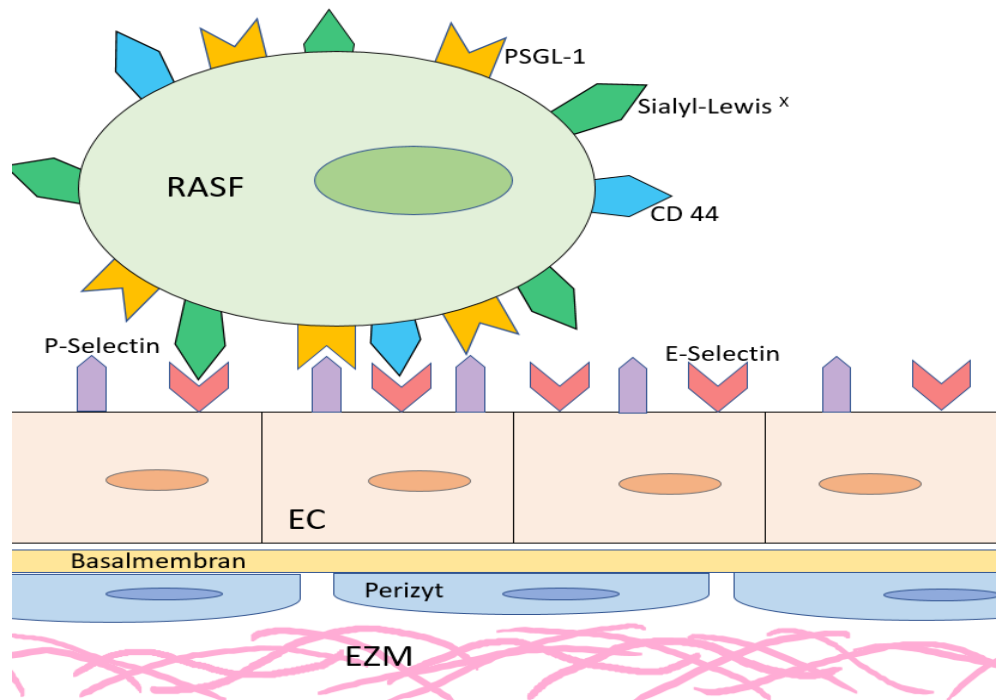


Abbildung 24: Schematische Darstellung des „Rollens“ der RASF

Quelle: Eigene Darstellung

Der Ablauf der Adhäsion der Leukozyten lässt sich auch auf die RASF übertragen. Dabei kommt es durch das entzündliche Milieu und die Flussbedingungen zur Aktivierung von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. P- und E-Selectin. Zu den Liganden von E-Selectin gehören neben Sialyl-Lewis unter anderem auch CD 44, das von RASF vermehrt exprimiert wird. Durch die kurze Bindung an die Selectine wird die Flussgeschwindigkeit der RASF reduziert und die Zellen können mit Chemokinen und dem Endothel in Kontakt treten.

Durch die Speicherung von P-Selectin in den Weibel-Palade-Körperchen ist P-Selectin direkt nach Stimulierung exprimiert (Doré und Sirois 1996). In verschiedenen Arbeiten konnte eine aktive Rolle von P-Selectin im Zuge der RA nachgewiesen werden (Littler et al. 1997; Weller et al. 1992). Dabei zeigt sich durch das entzündliche Milieu eine vermehrte Expression von P-Selectin. P-Selectin wird hierbei vermehrt in Venen und Venolen exprimiert (Weller et al. 1992).

In den durchgeführten Versuchen konnte nach Stimulation der EC mit den Adipokinen und der Basistherapeutika (s. Abb. 16) keine Veränderung der mRNA-Expression von P-Selectin nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Adipokine und vermutlich auch die Basistherapeutika keinen Einfluss auf die Expression von P-Selectin nach einer Stimulierungsdauer von 17 Stunden haben.

Zusätzlich supprimierte die Stimulation mit TNF- α nach 17 Stunden die Expression von P-Selectin signifikant (s. Abb. 16). Weller et al. (1992) zeigten in ihrer Arbeit, dass E- und P-Selectin nach zweistündiger Stimulation mit TNF- α ein Maximum der Proteinexpression bei murinen Endothelzellen erreichen. Nach zwei Stunden nimmt dieses Maximum wieder ab und es kommt zur einer zeitabhängigen Herunterregulation der Protein-

und mRNA-Expression von P-Selectin. Gotsch et al. (1994) konnten nachweisen, dass die Transkription von P-Selectin in murinen EC nach drei bis vier Stunden ein Maximum erreicht. Dies lässt vermuten, dass die Stimulationsdauer bei P-Selectin eine wichtige Rolle spielt und eine kürzere Stimulationsdauer mit einem anderen Ergebnis einhergehen könnte.

Zusätzlich ist zu beachten, dass P-Selectin Scherkräfte benötigt, um die Adhäsion an P-Selectin zu ermöglichen. Die rollenden Zellen lösen sich von P-Selectin, wenn die Flussbewegung stagniert (Ley et al. 2007). Bei den Flussversuchen zeigte sich trotz Stimulierung der EC über 17 Stunden mit TNF- α eine Zunahme der Adhäsion der RASF an EC (s. Abb. 22), wobei hier neben P-Selectin auch weitere Adhäsionsmoleküle (z.B. E-Selectin) eine Rolle spielen.

Das Rollen der RASF wird über die Bindung der Liganden an die Selectine der EC vermittelt (Ley et al. 2007). RASF im Synovium exprimieren vermehrt CD44, das neben Zell-Matrix-Kontakte auch die Bindung an E-Selectin ermöglicht (Naor und Nedvetzki 2003; Mikecz et al. 1995; Nedvetzki et al. 1999; Naor und Nedvetzki 2003; Dimitroff et al. 2001). Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Expression von CD44 durch RASF mittels Adipokine beeinflusst wird.

Es konnte keine Veränderung der CD44-Expression durch Adipokine oder IL-1 (s. Abb. 5) nachgewiesen werden. Ein Grund dafür könnten die hohe Zahl der einzelnen Isoformen sein. Es könnte sein, dass durch die verwendeten Primer nicht die betroffenen Isoformen untersucht wurden. Durch alternatives Splicing der zehn variablen Exons innerhalb der beiden konstanten Exonregionen können viele verschiedene Isoformen entstehen. Dadurch sind über 1000 verschiedene Isoformen möglich, von denen aktuell lediglich ca. 20 verschiedene Splicingvarianten bekannt sind (Mikecz et al. 1995; van Weering et al. 1993). Bislang wurden keine spezifischen Isoformen charakterisiert, die im Rahmen der RA eine Rolle spielen könnten. Möglicherweise wird zudem CD44 posttranskriptionell reguliert, sodass Änderungen nicht auf Transkriptionsebene erfasst werden können (van Weering et al. 1993).

Um dennoch die Rolle von CD44 bei der RA zu untersuchen, könnte man die Proteinexpression durch Western-Blot-Analysen unter Verwendung von Antikörpern gegen CD44 analysieren (Ariel et al. 2000). Der Vorteil der Western-Blot-Analysen ist, dass der Antikörper mehrere Isoformen gleichzeitig erfasst. Weiterhin ist es jedoch auch möglich, dass die Expression von CD44 bei den RASF nicht durch inflammatorische Zytokine bzw. Adipokine verändert wird, wie die Expressionsanalysen vermuten lassen (s. Abb. 5). CD44 besitzt drei verschiedene Zustände (Naor und Nedvetzki 2003): aktiv, nicht-aktiv und induzierbar. Es wäre möglich, dass CD44 in RASF durch den veränderten Phänotyp bereits vermehrt exprimiert wird und das entzündliche Milieu die Aktivierung

von CD44 induziert, wodurch eine Adhäsion z.B. an E-Selectin (s. Abb. 24) oder an die EZM verstärkt ermöglicht wird. So könnte die verstärkte Adhäsion im statischen Adhäsionsassay nach Stimulation mit Adipokinen (s. Abb. 18) und im dynamischen Adhäsionsassay nach Stimulierung mit Visfatin (s. Abb. 20 und 22) auch durch die Aktivierung von CD44 begründet sein.

E-Selectin ermöglicht das „Rollens“ der Zellen über das Endothel. Die Expression von E-Selectin kann in EC von Mäusen durch TNF- α induziert werden (Gotsch et al. 1994). Aus diesem Grund sollte zusätzlich auch die Expression von E-Selectin untersucht werden. Leider konnte, trotz mehrfacher Versuche, kein Primer-Paar generiert werden, welches die optimale Bedingung für die Durchführung der Real-time PCR erfüllte. Gegebenenfalls wäre es möglich über die Bestimmung der Proteinexpression weitere Informationen über den Einfluss der Adipokine und Basismedikamente auf E-Selectin zu erhalten.

4.1.2 Die Interaktion zwischen VCAM-1, ICAM-1 und Integrinen

In der Adhäsionskaskade folgt nach dem Rollen die feste Bindung von Zellen an das Endothel (s. Abb. 3). Dadurch können die zirkulierenden Zellen, wie z.B. RASF, weiter mit dem Endothel in Kontakt treten und weitere Prozesse intrazellulär aktiviert werden (Vestweber 2015). Durch die reduzierte Flussgeschwindigkeit können die Zellen verschiedene Chemokine aufnehmen, welche zur Aktivierung der Integrine führen können. Zusätzlich fördert das entzündliche Milieu (z.B. TNF- α) die Hochregulation von VCAM-1 und ICAM-1 der EC (s. Abb. 3 & 25; Klimiuk et al. 2004; Navarro-Hernández et al. 2009; Ley et al. 2007; Vestweber 2015).

Durch die vermehrte Expression von VCAM-1 und ICAM-1 können nicht nur RASF (s. Abb. 25), sondern auch andere Immunzellen an das Endothel adhären (Vestweber 2015; Ley et al. 2007) und im Verlauf weiter in das Entzündungskompartiment migrieren. Auch im Zuge dieser Forschungsarbeit führte die Stimulation der EC mit TNF- α zu einer signifikanten Hochregulation der Expression von ICAM-1 der EC (s. Abb. 15). VCAM-1 war durch TNF- α in allen Populationen hochreguliert (s. Abb. 14).

Durch die Stimulation der EC mit den Basistherapeutika kam es zu keiner Änderung der Expression beider Adhäsionsmoleküle. Vermutlich wird der entzündungshemmende Effekt der Glukokortikoide und Methotrexat im Rahmen der RA über andere Mechanismen als die Expressionsregulation von ICAM-1 und VCAM-1 der EC gesteuert.

Methotrexat hemmt die Aktivierung von EC (Majumdar und Aggarwal 2001). Es könnte daher sein, dass Methotrexat den Einfluss von TNF- α durch eine Inhibition der Aktivierung der EC reduziert.

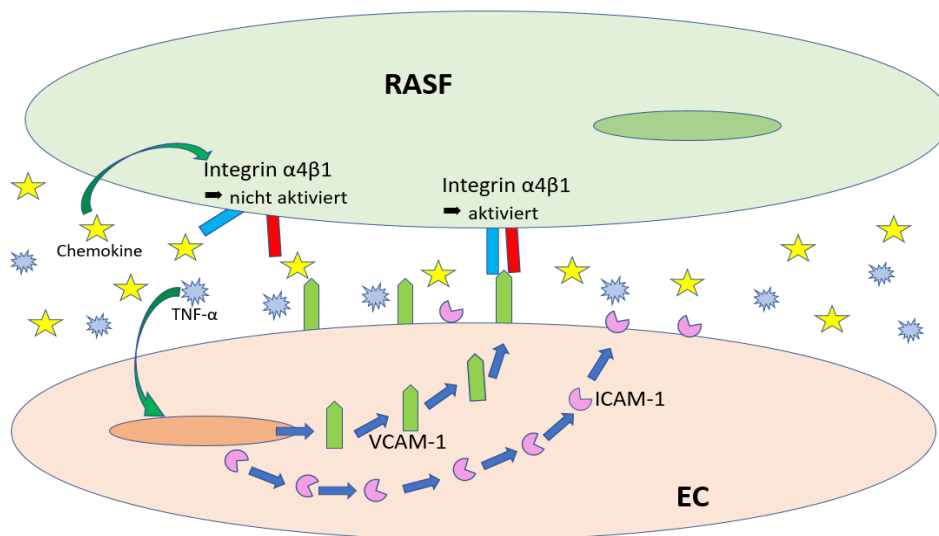


Abbildung 25: Interaktion von VCAM-1 und Integrinen

Quelle: Eigene Darstellung

Nach dem Rollen der RASF folgt die Adhäsion der RASF an die EC. Durch Chemokine kommt es über G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zur Aktivierung der Integrine (hier Integrin $\alpha 4\beta 1$) und der vermehrten Expression von VCAM-1 und ICAM-1 der EC. VCAM-1 kann mit Integrin $\alpha 4\beta 1$ der RASF interagieren und somit eine Adhäsion bewirken. ICAM-1 dient unter anderem als Bindungsstelle für Integrin $\alpha L\beta 2$, was z.B. von Lymphozyten exprimiert wird.

Im Vergleich dazu zeigte die Stimulation mit Adiponektin bei ICAM-1 der EC (s. Abb. 15) eine signifikante Reduktion der Expression. In Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen wird Adiponektin eine protektive Wirkung zugesprochen (Shibata et al. 2012). Dieses Ergebnis könnte durch die Reduktion der Adhäsion an das Endothel ebenfalls mit einer protektiven Wirkung im Rahmen der RA einhergehen. Da die RA mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko korreliert, wäre es möglich, dass Adiponektin auf beide Pathomechanismen in Bezug auf das Endothel protektiv wirkt.

Die Adipokine führten im Vergleich dazu zu keiner eindeutigen Veränderung der Expression von VCAM-1 der EC (s. Abb. 14). Tendenziell wies die Stimulierung mit Adiponektin eine Reduktion der VCAM-1-Expression durch die EC auf. Jedoch kann durch die starke Varianz der Daten keine konkrete Interpretation erfolgen. Verschiedene Arbeitsgruppen wiesen auch bei VCAM-1 eine Suppression der Expression durch Adiponektin in EC nach (Kawanami et al. 2004).

Aufgrund der aktuellen wissenschaftlichen Ergebnisse wäre ein protektiver Effekt bei der RA durch Reduktion der Adhäsion von Immunzellen und RASF an EC möglich. Dies bedarf weiterer Untersuchungen. Zudem könnten die Versuche mit EC von RA-Patienten erfolgen, da diese einem anderen Zytokin-Milieu ausgesetzt sind und demzufolge auf Stimulationen verändert reagieren könnten.

Andererseits konnte eine Korrelation zwischen dem Adiponektinspiegel im Serum und in der Synovialflüssigkeit, sowie dem Grad der RA nachgewiesen werden (Giles et al. 2009; Otero et al. 2006; Schäffler et al. 2003).

Eventuell kommt die erhöhte Konzentration des Adiponektins im Rahmen der RA dadurch zustande, dass die Wirkung von Adiponektin durch andere Adipokine (z.B. Resistin) aufgehoben wird (Al Hannan und Culligan 2015). Die Zellen könnten durch eine gesteigerte Adiponektinkonzentration versuchen, dennoch die Wirkung von Adiponektin aufrechtzuerhalten.

Interessanterweise führte die Stimulation der RASF mit Adiponektin im statischen Adhäsionstest zur vermehrten Adhäsion der RASF an EC (s. Abb. 18). Dies wirft die Frage auf, inwiefern Adiponektin *in vivo* tatsächlich protektiv wirken kann und ob Adiponektin unterschiedliche Wirkungen auf verschiedene Zellgruppen aufweist.

Durch Chemokine kommt es zur Aktivierung von Integrinen, die unter anderem auch von RASF exprimiert werden (Lowin und Straub 2011). Dabei vermitteln Integrine neben Zell-Zell-Bindungen auch Bindungen an die EZM und sind zudem an Prozessen, wie z.B. Adhäsion, Migration, Invasion und Produktion von Zytokinen und MMP, beteiligt. Integrin $\alpha 4 \beta 1$ der RASF dient z.B. als Bindungspartner für VCAM-1 der EC (s. Abb. 25; Rinaldi et al. 1997; Barbadillo et al. 1995) und wurde vermehrt im RA-Synovium nachgewiesen (Firestein 1996).

Die Stimulierung der RASF mit den Adipokinen (s. Abb. 7 & 9) führte zu keiner Veränderung der Expression der Untereinheiten $\alpha 4$ und $\beta 1$. Auch die Stimulierung mit TNF- α wies keine veränderte Expression der Untereinheiten auf. Vermutlich beeinflussen weder die Adipokine noch TNF- α die Adhäsion über die Genexpression. Eventuell wäre es möglich, dass die Adipokine und TNF- α zu einer Aktivierung beider Untereinheiten führen und somit die Adhäsion der RASF an EC begünstigen (Campbell und Humphries 2011). Diesbezüglich gibt es bislang keine wissenschaftlichen Daten.

Die Basistherapeutika führten nach Stimulierung der RASF ebenfalls zu keiner veränderten Expression beider Untereinheiten (s. Abb. 7 & 9).

Unter Berücksichtigung der Daten der statischen und dynamischen Zell-Adhäsionsversuche zeigt sich, dass sich das Adhäsionsverhalten der RASF unter Einsatz der Adipokine und Glukokortikoide verändert (s. Abb. 18, 20, 22 & 23). Der Einfluss der Stimulanzen auf die Adhäsion könnte durch einen veränderten Grad der Aktivierung der Integrine begründet sein.

4.1.3 Die Adhäsion der Integrine an die EZM

Durch die unterschiedlichen Kombinationen der α - und β -Untereinheiten sind verschiedene Bindungen möglich (s. Abb. 25 & 26). Bestimmte Untereinheiten bzw. Kombinationen der Untereinheiten zeigen eine vermehrte Bindung der EZM (Ley et al. 2007; Vestweber 2015). Dadurch kommt es unter anderem zur Akkumulation von verschiedenen Zellen (z.B. Immunzellen) im Entzündungsgebiet. Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen im RA-Synovium exprimieren verstärkt Integrine (Rinaldi et al. 1997; Lowin et al. 2009; Lowin und Straub 2011).

Integrin $\alpha 2$ bindet vermehrt die Komponenten Kollagen, Laminin und Tenascin der EZM (s. Abb. 26; Rinaldi et al. 1997) ein. Die Kombination der beiden Untereinheiten $\alpha 2$ und $\beta 1$ führt z.B. zur stärkeren Bindung von Kollagen und Laminin (Rinaldi et al. 1997; Ezoë und Horikoshi 1993). RASF im Synovium exprimieren vermehrt Integrin $\alpha 2$ (Rinaldi et al. 1997).

Zur Untersuchung der Einflüsse der Adipokine und Basistherapeutika auf die Expression von Integrin $\alpha 2$ erfolgte die Expressionsanalyse nach Stimulation der RASF.

TNF- α , als pro-entzündliches Zytokin, führte bei einzelnen Populationen zu einer starken Steigerung der Expression durch die RASF (s. Abb. 6), wodurch eine verstärkte Bindung an die EZM begünstigt werden könnte. Es konnte jedoch kein signifikantes Ergebnis erzielt werden. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch nach der Stimulation von dermalen Fibroblasten mit TNF- α (Ezoë und Horikoshi 1993). Zusätzlich führte die Blockierung von Integrin $\alpha 2\beta 1$ durch einen Antikörper zur Reduktion der Adhäsion von dermalen Fibroblasten an die EZM (Ezoë und Horikoshi 1993).

Die Stimulierung mit den Adipokinen erreichte keine signifikante Änderung der Expression von Integrin $\alpha 2$ (s. Abb. 6).

Auch Dexamethason veränderte nicht die Expression von Integrin $\alpha 2$ (s. Abb. 6), so dass vermutlich der entzündungshemmende Effekt nicht über die Genexpression von Integrin $\alpha 2$ vermittelt wird. Es wäre jedoch möglich, dass durch eine Reduktion der Aktivität der RASF (Gossye et al. 2009) die Aktivierung der Integrine inhibiert und die Bindung der EZM dadurch gemindert wird.

Die Stimulation mit Prednisolon, MTX (RA) und MTX (C) wies eine starke Streuung der Einzelergebnisse auf (s. Abb. 6), so dass ebenfalls keine Signifikanz erreicht wurde. Zwei Populationen reagierten allerdings mit einer verstärkten Expression nach Stimulation mit Prednisolon. Wenn man das Ergebnis der restlichen Populationen ($n=6$) betrachtet (s. Abb. 6), zeigt sich keine Veränderung der mRNA-Expression von Integrin $\alpha 2$ nach Stimulation Prednisolon.

Die Wirkung von Methotrexat auf die Expression von Integrin $\alpha 2$ ist nicht näher beschrieben. Die Daten lassen hier vermuten, dass Methotrexat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Integrin $\alpha 2$ nimmt. Zusätzlich könnte es sein, dass der entzündungshemmende Effekt von Methotrexat hier nicht über die mRNA-Expression von Integrin $\alpha 2$ erfolgt. Die reduzierte Aktivierung der RASF könnte zu einer reduzierten Aktivierung der Integrine und daraus resultierend geminderten Adhäsionsfähigkeit führen.

Tenascin, als Bestandteil der EZM (s. Abb. 26), wurde im Synovium nachgewiesen und wird vermehrt von RASF über Integrin $\alpha v \beta 3$ gebunden (Rinaldi et al. 1997). Aufgrund dessen erfolgte eine Untersuchung der Untereinheit αv . RASF weisen eine erhöhte Expression dieser Untereinheit verglichen mit SF von Arthrose-Patienten auf (Neidhart et al. 2005) und sie scheint für die Invasion der RASF in den Knorpel notwendig zu sein (Treese et al. 2008).

Die Stimulierung mit TNF- α führte zu einer signifikant gesteigerten Expression der Untereinheit um das 2,85-fache (s. Abb. 8). Auch Neidhart et al. (2005) konnten eine verstärkte Expression von Integrin αv nach TNF- α -Stimulation aufweisen. Diese vermehrte Expression kann mit einer verstärkten Bindung an die EZM einhergehen (s. Abb. 26), wodurch die RASF vermehrt im Synovium gehalten werden können.

Obwohl Visfatin und Resistin als proentzündliche Adipokine angesehen werden, veränderten sie die Expression von Integrin αv nicht, ebenso wie Adiponektin (s. Abb. 8). Eventuell wird der Einfluss der Adipokine nicht durch eine Veränderung der Expression dieser Untereinheit verursacht. Es könnte jedoch sein, dass die Adipokine über andere Signalwege zur Aktivierung von Integrin αv führen und dadurch die Adhäsion an die EZM beeinflussen. Hierzu liegen bisher keine Untersuchungen vor.

Dexamethason, Prednisolon, MTX (RA) und MTX (C) wiesen ebenfalls keinen Effekt auf die Expression auf (s. Abb. 8). Der entzündungshemmende Effekt der Basistherapeutika wird vermutlich nicht über die mRNA-Expression von Integrin αv vermittelt. Wie bereits bei den vorherigen Integrinen diskutiert, könnte der Einsatz der Glukokortikoide und des Methotrexats die Aktivierung der RASF reduzieren (Spurlock et al. 2015; Gossye et al. 2009) und somit über andere Signalwege auch die Aktivierung der Integrine beeinflussen.

Fibronectin ist ein weiterer Bestandteil der EZM (s. Abb. 26). In der RA wird Fibronectin vermehrt in der Intimaschicht des Synoviums und im Pannus exprimiert (Yasuda 2006). Fibronectin wird unter anderem von den Integrinen $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 3$ und $\alpha v \beta 5$ im Synovium gebunden (Lowin und Straub 2011). Der Einfluss auf die Expression der Untereinheit Integrin αv wurde in dieser Arbeit bereits untersucht, so dass eine zusätzliche Untersuchung des Kombinationspartners $\beta 5$ erfolgte.

Alle eingesetzten Adipokine führten zu keiner Expressionsänderung (s. Abb. 10). Auch TNF-alpha zeigte keinen Einfluss auf die Expression. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Adipokine die Bindung an Fibronektin nicht auf der Ebene der Expression beeinflussen. Dasselbe Bild zeigte sich beim Bindungspartner Integrin αv (s. Abb. 8).

Im Gegensatz dazu erhöhte TNF- α die Expression von Integrin αv signifikant (2,85-fach; $p=0,0280$). Möglicherweise kommt es durch die vermehrte Expression der αv -Untereinheit durch TNF- α dennoch zur gesteigerten Bindung an Fibronektin, da Integrin $\beta 5$ bereits im Rahmen der RA vermehrt exprimiert wird.

Die eingesetzten Therapeutika führten zu keiner signifikanten Änderung der Expression von Integrin $\beta 5$ durch die RASF (s. Abb. 10). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die antiinflammatorische Wirkung der Therapeutika über einen anderen Weg als die mRNA-Expression von Integrin $\beta 5$ erfolgt. Es wäre möglich, dass die Wirkung der Therapeutika über eine Inhibition der Aktivierung der RASF (Gossye et al. 2009; Spurlock et al. 2015) und damit auch die der Integrine erfolgt.

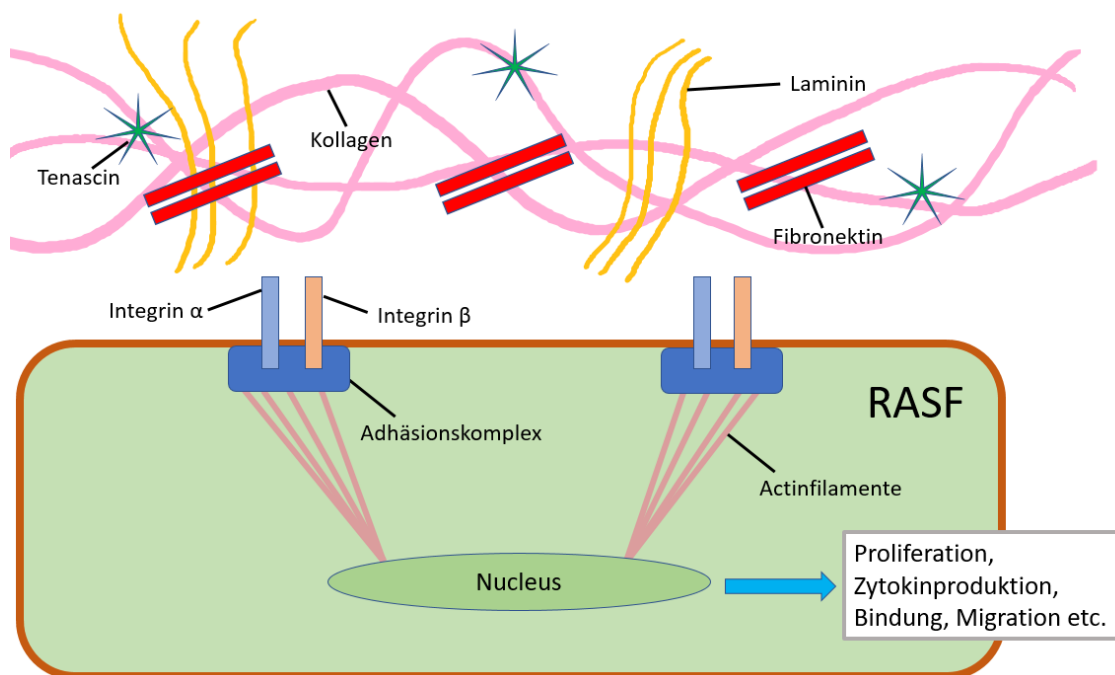


Abbildung 26: Vereinfachte Darstellung der EZM-Bindung der Integrine

Quelle: Eigene Darstellung

Durch die Kombination aus verschiedenen α - und β -Untereinheiten der Integrine sind Bindungen zwischen Zellen und mit den Komponenten der EZM möglich. Durch intrazelluläre Signalwege nach Bindung der Integrine kommt es zu verschiedenen Prozessen. Somit wird die Proliferation, Proteinsynthese, Bindung und viele weitere Mechanismen getriggert.

Die Stimulation mit Prednisolon induzierte in einer einzelnen Population eine um das 95-fache Expressionserhöhung von Integrin $\beta 5$. Die restlichen Populationen wiesen kaum

eine veränderte mRNA-Expression auf. Ein ähnliches Bild war bei MTX (C) zu beobachten. Zwei der Populationen reagierten mit einer verstärkten Induktion der Expression (2,7-fach & 5,5-fach). Die Expression der restlichen Populationen (n=3) wurde tendenziell nicht beeinflusst (s. Abb. 10).

Insgesamt zeigte sich bei den Integrin-Analysen folgendes Gesamtbild:

Die β -Einheiten wiesen keine Veränderung nach den Stimulationen auf. Im Gegensatz dazu wurden die α v- und α 2-Untereinheit durch entzündliche Faktoren wie TNF- α induziert, wodurch eine vermehrte Adhäsion an die EZM vermittelt werden könnte. Der Einsatz der Basismedikamente führte insgesamt zu einem stark variierenden Ergebnis, so dass daraus keine konkreten Schlussfolgerungen ableitbar waren. Der entzündungshemmende Effekt der Basismedikamente wird vermutlich nicht über eine veränderte mRNA-Expression der untersuchten Adhäsionsmoleküle erzielt.

4.1.4 Bildung der Intima-Schicht des Synoviums durch Cadherin-11

Die Intima-Schicht des Synoviums besteht unter anderem aus einem Netzwerk von SF, welche durch Zell-Zell-Kontakte und EZM eine Schicht bilden. Kiener et al. (2006) zeigten, dass hier die Zell-Zell-Kontakte über Cadherin-11 (s. Abb. 27) eine wichtige Rolle spielen.

Keine der Stimulierungen (Adipokine, TNF- α , Glukokortikoide, MTX (RA)) veränderte die mRNA-Expression von Cadherin-11 (s. Abb. 11). MTX (C) induzierte die Expression von Cadherin-11 bei einer einzelnen Zellpopulation überdurchschnittlich hoch, so dass das Ergebnis nicht signifikant war (s. Abb. 11). Bei den restlichen Populationen (n=5) zeigte sich keine Veränderung der Expression. Vermutlich führt die Stimulation mit MTX (C) zu keiner Veränderung der mRNA-Expression von Cadherin-11.

Auch Vandooren et al. (2008) zeigten, dass TNF- α zu keiner Veränderung der mRNA-Expression von Cadherin-11 durch RASF führt. Sie konnten jedoch eine verstärkte Proteinexpression von Cadherin-11 durch TNF- α in der Intimaschicht nachweisen. Vermutlich beeinflusst TNF- α nicht die Transkription von Cadherin-11. Jedoch konnte die Translation von Cadherin-11 durch TNF- α beeinflusst werden. Eventuell könnten auch die Adipokine und Basismedikamente die Proteinexpression von Cadherin-11 verändern, wodurch in der Intimaschicht die Bindung der RASF untereinander und die Pannusbildung beeinflusst werden könnte.

Immunhistochemisch konnte bei RA-Patienten nach 14-tägiger oraler Steroidtherapie eine Reduktion des Cadherin-11 im Synovium nachgewiesen werden (Vandooren et al.

2008). Dies könnte durch eine verminderte Proteinexpression begründet sein. Vermutlich supprimieren die Glukokortikoide die Proteinexpression von Cadherin-11, wodurch eine Reduktion der Zell-Zell-Kontakte der RASF im Synovium erzielt wird.

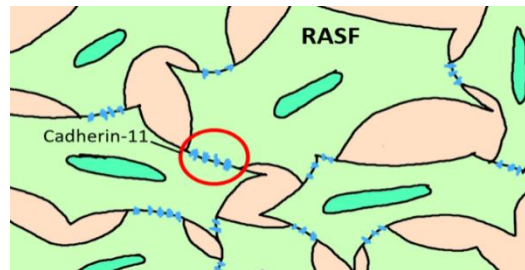


Abbildung 27: Cadherin-11 bedingte Bindung von RASF

Quelle: Eigene Darstellung

Cadherin-11 ist unter anderem für die Formationsbildung in Geweben und Erhalt der Gewebestruktur verantwortlich. In der Intimaschicht von RA-Patienten wird vermehrt Cadherin-11 immunhistochemisch nachgewiesen. Typische Adhäsionsmoleküle, wie z.B. tight junctions, Desmosomen oder eine Basalmembran für die Strukturbildung des Synoviums fehlen in der Intimaschicht, so dass die Gewebestruktur unter anderem durch Cadherin-11 über Zell-Zell-Kontakte zustande kommt. Durch die Bindung von Cadherin-11 wird zusätzlich die Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und MMP begünstigt, so dass Cadherin-11 auch eine direkte Rolle in der Inflammation spielt.

4.1.5 Interaktion von RASF mit Leukozyten

VCAM-1 und ICAM-1 wurden nicht nur in den Seren von RA-Patienten vermehrt nachgewiesen. Die RASF exprimieren verstärkt VCAM-1 und ICAM-1 (Ahmed et al. 2013; Navarro-Hernández et al. 2009; Lee und Weinblatt 2001; Marlor et al. 1992).

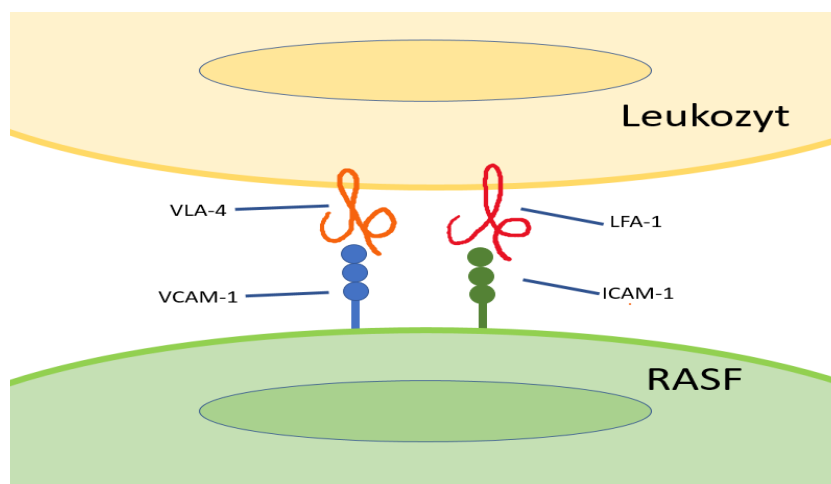


Abbildung 28: Zell-Zell-Bindung der RASF mit Leukozyten

Quelle: Eigene Darstellung

VCAM-1 und ICAM-1 werden vermehrt durch RASF exprimiert und ermöglichen dadurch die Bindung an die jeweiligen Liganden (VLA-4 und LFA-1), die von Leu-

kozyten exprimiert werden. Dadurch wird eine Bindung zwischen RASF und Leukozyten ermöglicht, so dass vermehrt Leukozyten an den Ort der Entzündung rekrutiert werden können.

Ihre Liganden werden auch von Leukozyten exprimiert, so dass beide Zellen miteinander interagieren können (s. Abb. 28; Marlor et al. 1992; Lee und Weinblatt 2001).

In den Stimulationsversuchen induzierte TNF- α tendenziell die mRNA-Expression von VCAM-1 und ICAM-1 der RASF (s. Abb. 12 & 13). Die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant. Eine Hochregulation durch TNF- α zeigte sich auch in den bisherigen Daten anderer Arbeitsgruppen (Marlor et al. 1992; Lee und Weinblatt 2001; Chin et al. 1990). Dies kann die Adhäsion der RASF und Leukozyten verstärken (s. Abb. 28).

Adiponektin beeinflusste weder die mRNA-Expression von VCAM-1 noch von ICAM-1 (s. Abb. 12 & 13). Vermutlich hat Adiponektin keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von VCAM-1 und ICAM-1 der RASF. Im Vergleich dazu führte Adiponektin bei den EC zu einer Reduktion der Expression von ICAM-1 (s. Abb. 15). Dies spielt jedoch eher eine Rolle bei der Adhäsion der RASF an das Endothel im Rahmen der Adhäsionskaskade (s. Abb. 3), wohingegen die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 durch RASF im Synovium zur Rekrutierung von Immunzellen dient und Immunzellen dadurch am Ort der Entzündung gehalten werden (s. Abb. 28).

Die Stimulation mit Visfatin steigerte die Expression von VCAM-1 signifikant um das 2,4-fache (s. Abb. 12). Die Expression von ICAM-1 blieb dagegen durch Visfatin unbeeinflusst (s. Abb. 13). Somit könnte Visfatin durch eine Erhöhung der VCAM-1-Expression die Interaktion zwischen RASF und Leukozyten über die jeweiligen Adhäsionsmoleküle fördern. Visfatin könnte somit, als proentzündliches Molekül, die durch TNF- α stark induzierte Expression zusätzlich begünstigen.

Bei der Stimulation mit Glukokortikoiden zeigte sich, dass sowohl Prednisolon als auch Dexamethason die mRNA-Expression von VCAM-1 signifikant reduzieren (s. Abb. 12). Die ICAM-1-Expression wurde durch die Glukokortikoide nicht beeinflusst (s. Abb. 13). Tessier et al. (1996) konnten darlegen, dass eine Vorstimulation der RASF mit Dexamethason, die durch TNF- α induzierte Genexpression von VCAM-1 und ICAM-1 reduzieren kann. Im Vergleich dazu konnten die durchgeführten Versuche (s. Abb. 12) sogar eine Reduktion der mRNA-Expression von VCAM-1 durch die RASF ohne vorherige Stimulation mit TNF- α nachweisen. Dies könnte die Adhäsion der RASF an die Leukozyten reduzieren, das Rekrutieren von Leukozyten dadurch mindern und die Krankheitsaktivität somit einschränken.

MTX (RA) und MTX (C) führten zu keiner signifikanten Veränderung der mRNA-Expression von VCAM-1 und ICAM-1 (s. Abb. 12 & 13).

Insgesamt war bei der Expression von VCAM-1 eine durch Visfatin signifikant erhöhte mRNA-Expression zu beobachten, so dass die Adhäsionsfähigkeit der RASF an Leukozyten begünstigt werden kann. Dies könnte die durch TNF- α resultierende starke Expressionsinduktion zusätzlich unterstützen und über die vermehrte Adhäsion beider Zellen die Krankheitsaktivität fördern. Interessanterweise führte der Einsatz von Glukokortikoiden zu einer signifikanten Reduktion von VCAM-1. Der Einfluss der Adipokine auf die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 der RASF war bislang unbekannt. Auch der Aspekt, dass die Glukokortikoide ohne eine Aktivierung der RASF durch TNF- α zur Reduktion der mRNA-Expression von VCAM-1 führen können, ist eine neue Erkenntnis, die den Pathomechanismus der RA weiter erklären könnte.

4.2 Das Adhäsionsverhalten der RASF im Zell-Zell-Versuch

Um funktionell zu prüfen, welchen Einfluss die beobachteten Veränderungen der Expression von Adhäsionsmolekülen auf die Adhäsionsfähigkeit der RASF mit EC haben, wurde zunächst ein statischer Adhäsionstest mit TNF- α -aktivierten EC durchgeführt.

In den statischen Adhäsionsversuchen begünstigten die Adipokine die Interaktion der RASF mit den EC signifikant (Abb. 18). Dies bekräftigt die Hypothese, dass die Adipokine im Rahmen der Adhäsion eine aktive Rolle spielen und vermutlich durch die Induktion bzw. Aktivierung verschiedener Adhäsionsmoleküle die Interaktion beider Zellen miteinander begünstigen und somit eine proinflammatorische Rolle bei der RA einnehmen. In den Expressionsanalysen zeigte sich bei den ausgewählten Adhäsionsmolekülen, die bei der EC-RASF-Interaktion eine Rolle spielen, wie z.B. P-Selectin, CD44 und Integrin $\alpha 4\beta 1$ (Abb. 5, 6, 9 und 16), dass keine Veränderung der mRNA-Expression erkennbar war. Wahrscheinlich führen die Adipokine über andere Wege, wie z.B. Proteinexpression oder Aktivierung der Integrine, zu einer verstärkten Adhäsion der RASF an EC.

Die Adhäsion der RASF an die EC war durch TNF- α unter statischen Bedingungen verstärkt. TNF- α könnte über eine Aktivierung der RASF verschiedene Integrine aktivieren, die z.B. eine Bindung von VCAM-1 der EC begünstigen. Zusätzlich wäre es möglich, dass die Protein- und Genexpression verschiedener Adhäsionsmoleküle induziert werden, wodurch die Adhäsion der RASF an die EC gefördert wird. Das aktivierte Endothel sezerniert zudem Chemokine, die das Aktivieren der Integrine begünstigt (Lowin und Straub 2011). P-Selectin scheint dabei unter statischen Bedingungen weniger eine Rolle zu spielen, da es erst unter Flussbedingungen zur Aktivierung von P-Selectin kommt (Doré und Sirois 1996; Weller et al. 1992). Integrin $\alpha 4\beta 1$ könnte durch EC-sezernierte

Chemokine im statischen Modell aktiviert werden und zur vermehrten Adhäsion beitragen. Mithilfe eines Antikörpers gegen Integrin $\alpha 4\beta 1$ könnte man diese Theorie weiter untersuchen.

Im Gegensatz dazu bewirkte die Stimulation mit Prednisolon eine signifikante Reduktion der Adhäsion (Abb. 18 B). Die Expression von Integrin $\alpha 4\beta 1$ war durch die Therapeutika aber nicht verändert (s. Abb. 7 & 9). Eventuell resultiert die reduzierte Expression anderer Adhäsionsmoleküle in eine geminderte Adhäsion. Zusätzlich führen Glukokortikoide und Methotrexat zur Hemmung der RASF-Aktivierung (Spurlock et al. 2015; Gossye et al. 2009). Dadurch könnten weitere Signalwege, die für die Aktivierung oder Proteinsynthese von Adhäsionsmolekülen notwendig sind, gehemmt werden. Aufgrund dessen wäre die reduzierte Adhäsion der RASF an EC unter statischen Bedingungen teilweise erklärbar. Durch die geminderte Adhäsionsfähigkeit der RASF an EC treten vermutlich weniger RASF in die Adhäsionskaskade (s. Abb. 3) ein. Dieser Aspekt könnte unter anderem den entzündungshemmenden Effekt von Prednisolon begründen.

Für die Versuche wurden primäre Zellen verwendet. Da die synovialen Fibroblasten bereits von Patienten mit etablierter RA stammen, muss auch berücksichtigt werden, dass die Zellen möglicherweise bereits im Körper einer erhöhten Konzentration an Adipokinen ausgesetzt waren (Toussirot et al. 2012; Otero et al. 2006; Rho et al. 2009; Tan et al. 2009; Ariel et al. 2000). Dies könnte die Empfindlichkeit gegenüber Adipokinen beeinflussen.

Ein weiterer Aspekt ist auch, dass die Patienten in allen Fällen bereits eine RA-spezifische Therapie erhielten. Die Wirkung der Basistherapeutika auf die RASF könnte in den Versuchen dadurch verändert sein. Dies wäre ein weiterer Grund für die variierenden Ergebnisse nach der Stimulation mit den Basistherapeutika, vor allem bei MTX.

Zudem stammten die Endothelzellen aus operativ entfernten Varizen. Diese entfernten Venen zeigen krankhafte Veränderungen, die aber nicht unbedingt mit denen im Rahmen einer RA zu vergleichen sind. Das Endothel im Synovium ist über längere Zeit einer erhöhten Konzentration proinflammatorischer Faktoren ausgesetzt. Auch die Adipokine wirken in erhöhter Konzentration auf das synoviale Endothel. Bei den statischen Adhäsionsversuchen wurden die EC lediglich mit TNF- α inkubiert, so dass der Einfluss der Adipokine und Basismedikamente auf die EC bei diesem Versuch nicht untersucht wurde.

Womöglich weisen die EC von RA-Patienten Adhäsionsmoleküle auf, welche durch die chronische Stimulierung im Zuge des Krankheitsprozesses überexprimiert sind. Infolge von Entzündungen werden unter anderem VCAM-1 und ICAM-1 des Endothels vermehrt exprimiert (Ley et al. 2007; Vestweber 2015). Vermutlich führen proinflammatorische Zytokine zu einer weiteren Induktion und Aktivierung von Adhäsionsmolekülen. Durch den

Einsatz von TNF- α -Blockern konnte eine Reduktion der Expression verschiedener löslicher Adhäsionsmoleküle im Serum von RA-Patienten nachgewiesen werden (Klimiuk et al. 2004). Die chronische Entzündung könnte nachfolgend zur vermehrten Expression verschiedener Rezeptoren führen, die intrazelluläre Prozesse für eine Zelladhäsion begünstigen. Zudem könnte die chronische Entzündung zu einem verstärkten Expressionsmuster verschiedener Adhäsionsmoleküle führen, die unabhängig von Signalwegen ist, ähnlich wie in Tumorzellen. Dies ist unter anderem durch Mutationen in Genom möglich (Luzzatto und Pandolfi 2015).

Zusammenfassend zeigte sich unter statischen Bedingungen eine signifikante Adhäsionssteigerung der RASF an EC nach Stimulation mit den ausgewählten Adipokinen. Die Stimulation der RASF mit Prednisolon reduzierte die Adhäsion der RASF an die EC-Schicht signifikant. Dies unterstützt die Hypothese der proinflammatorischen Rolle der Adipokine im Rahmen der RA.

4.3 Das Adhäsionsverhalten der RASF unter Flussbedingungen

RASF können unter Flussbedingungen an E-Selectin und an aktivierten Endothelzellen verstärkt adhären (Zimmermann 2011). Unter Flussbedingungen kommt es durch die Scherkräfte unter anderem zur Aktivierung von P- und E-Selectin (Richter et al. 2011; Doré und Sirois 1996; Gotsch et al. 1994). Dadurch wird das Rollen der zirkulierenden Zellen entlang des Endothels begünstigt (s. Abb. 3).

Visfatin wies bei beiden Flussversuchen (E-Selectin- und HUVEC-beschichtete Kanäle) über alle Flussgeschwindigkeiten eine Zunahme der Adhäsion auf (Abb. 20 & 22), was seine Rolle als entzündungsförderndes Adipokin (Meier et al. 2012) bestärken könnte. Vor allem bei niedriger (s. Abb. 22) und mittlerer Flussgeschwindigkeit (s. Abb. 20) zeigten sich hierbei signifikante Ergebnisse. Auch im Rahmen des statischen Adhäsionstests steigerte Visfatin die Adhäsion signifikant (s. Abb. 18 A&B).

Wie bereits im Abschnitt 4.2. erläutert, wies die Stimulation mit den Adipokinen keine Änderung der mRNA-Expression der ausgewählten Adhäsionsmoleküle auf, die unter anderem bei der Adhäsion der RASF an EC beteiligt sind (z.B. Integrin $\alpha 4\beta 1$, CD 44; s. Abb. 5, 7 & 9). Eventuell führen die Adipokine über andere Wege, wie z.B. Proteinexpression oder Aktivierung der Integrine zu einer verstärkten Adhäsion der RASF an die EC. Das entzündliche Milieu aktiviert insgesamt RASF und EC (Neumann et al. 2010a; Vestweber 2015). Zusätzlich sezernieren EC Chemokine, welche die Aktivierung von Integrinen der RASF fördern (Vestweber 2015; Ley et al. 2007) und unter anderem dadurch eine verstärkte Adhäsion der RASF an EC begünstigen.

Bei den mit E-Selectin beschichteten Kanälen konnte im Flussversuch nach Resistinstimulation keine signifikante Veränderung der Adhäsion (s. Abb. 20) nachgewiesen werden. Vermutlich nimmt Resistin keinen Einfluss auf die Bindung von E-Selectin und seinen durch RASF exprimierten Liganden (z.B. CD 44, Sialyl-Lewis^x).

Auch im Flussversuch mit HUVEC-beschichteten Kanälen konnten keine signifikanten Veränderungen der Adhäsion festgestellt werden (s. Abb. 22). Bei niedrigerer Geschwindigkeit zeigte sich jedoch tendenziell eine Zunahme der Adhäsion durch Resistin (Zunahme um 57%, s. Abb. 22), die jedoch nicht signifikant war. Die Adhäsion nahm mit zunehmender Flussgeschwindigkeit ab. Dies ist unter anderem durch die Zunahme der Scherkräfte, die Abnahme der Verwirbelungen im Fluss und die Konzentration der Zellen in der Mitte des Lumens begründet (Ando und Yamamoto 2009).

Die Ergebnisse im HUVEC-Flussversuch geben Hinweise auf die proinflammatorische Rolle von Resistin im Rahmen der RA. Resistin könnte somit durch die Förderung der Adhäsion der RASF an das Endothel das Eintreten der RASF in die Adhäsionskaskade (s. Abb. 3) unterstützen und vor allem die initialen Schritte im Krankheitsprozess der RA dadurch begünstigen.

TNF- α steigerte die Adhäsion der RASF an E-Selectin nicht signifikant (s. Abb. 20), möglicherweise werden die Liganden (s. Abb. 24) von E-Selectin durch TNF- α nicht vermehrt exprimiert bzw. aktiviert.

Das Ergebnis im HUVEC-Flussversuch nach Stimulation der RASF mit TNF- α war dagegen eindeutiger:

TNF- α steigerte die Adhäsion der RASF an die HUVEC signifikant um 18% bei mittlerer Geschwindigkeit (s. Abb. 22). Bei den restlichen Flussgeschwindigkeiten kam es zu einer verstärkten Adhäsion der RASF an HUVEC, die jedoch nicht signifikant war. Die Stimulation mit TNF- α diente hier ebenfalls als Positivkontrolle. Die vermehrte Adhäsion der RASF durch TNF- α erfolgt durch Expression und Aktivierung verschiedener Adhäsionsmoleküle bei der RA (Chen et al. 2004; Lefèvre et al. 2009; Neumann et al. 2010a). Unter der Stimulierung mit Dexamethason kam es zur Reduktion der Adhäsion beim Flussversuch mit HUVEC-beschichteten Kanälen. Hierbei war das Ergebnis bei höchster Flussgeschwindigkeit signifikant. Dexamethason könnte aktiv die Expression der beteiligten Adhäsionsmoleküle, wie z.B. Sialyl-Lewis (s. Abb. 3 & 24), für die Bindung an E-Selectin herunterregulieren oder den Signalweg zur Aktivierung von Integrinen der RASF blockieren. Zudem führen Glukokortikoide zur Inhibition der Aktivierung über den NF- κ B-Signalweg der RASF, wodurch die Adhäsion an EC, EZM oder anderen zirkulierenden Zellen ebenfalls beeinflusst werden könnte (Gossye et al. 2009).

Prednisolon führte innerhalb des E-Selectin-Flussversuches zu keiner starken Veränderung der Adhäsion der RASF an E-Selectin (s. Abb. 20). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Prednisolon die Expression der Liganden von E-Selectin (s. Abb. 3 & 24) nicht direkt beeinflusst. Vermutlich wird die Expression der Liganden von E-Selectin nicht durch die Inhibition der Aktivierung der RASF über den NF- κ B-Signalweg beeinflusst (Gossye et al. 2009).

Im Vergleich dazu führte Prednisolon über alle Geschwindigkeiten hinweg zu einer Reduktion der Adhäsion im Rahmen des HUVEC-Flussversuches. Das Ergebnis bei hoher Geschwindigkeit war dabei stark signifikant. Vermutlich führt die Stimulation mit Prednisolon zu verminderter Expression und reduzierter Aktivierung verschiedener Adhäsionsmoleküle der RASF, wodurch die Adhäsion der RASF an die HUVECs verringert wird. Eventuell könnte hier die inhibierte Aktivierung der RASF eine Hemmung der Adhäsion der RASF verursachen. Wie auch bereits bei der Stimulation mit Dexamethason beschrieben, könnte dies zu einer Verminderung der „rollenden“ RASF-Zahl führen, wodurch weniger RASF in die Adhäsionskaskade eintreten können und somit die ersten Schritte des Krankheitsprozesses gehemmt werden.

Die Ergebnisse nach Stimulation mit beiden MTX-Konzentrationen beim E-Selectin-beschichteten-Flussversuch variierten stark (s. Abb. 20). Vor allem MTX (C) führte bereits bei den mRNA-Analysen zu stark variierenden Ergebnissen (s. Abb. 6, 8, 9, 10, 11, 12 & 13), so dass man auch hier die Einzelergebnisse näher betrachten muss. Tendenziell führte die Stimulation mit MTX (RA) zu einer Reduktion der Adhäsion an E-Selectin. Eine Population zeigte jedoch bei der mittleren Geschwindigkeit sowohl unter Stimulation mit MTX (RA) als auch mit MTX (C) eine starke Zunahme der Adhäsion. Hierbei handelt es sich bei beiden Versuchen um dieselbe Population. Durch die geringe n-Zahl (n=3) ist es schwierig aus den übrigen Populationen ein eindeutiges Ergebnis abzuleiten.

Vermutlich führt MTX (RA) zu einer Reduktion der Bindung von E-Selectin an seine Liganden. Dies könnte durch eine verminderte Expression oder reduzierte Aktivierung der RASF hervorgerufen werden. Auch bei den HUVEC-Flussversuchen variierten die Ergebnisse unter MTX-Stimulation stark. Hier reagierte eine Population unter MTX-Stimulation (beide Konzentrationen) ebenfalls mit einer Zunahme der Adhäsion der RASF an HUVEC. Beurteilt man die restlichen beiden Populationen, war unter Stimulation mit MTX (C) eher eine Reduktion der Adhäsion der RASF zu beobachten. Aufgrund der niedrigen Versuchszahl können noch keine eindeutigen Schlussfolgerungen gezogen werden. Methotrexat könnte aber zu einer Reduktion der Aktivität der RASF führen (Spurlock et al. 2015) und dadurch die Adhäsion vermindern.

Insgesamt zeigte sich im Rahmen der Flussversuche (s. Abb. 20 & 22), dass Visfatin, vor allem in der Interaktion zwischen RASF und HUVEC, zu einer Zunahme der Adhäsion beider Zellen führte. Visfatin verursachte dabei sogar eine stärkere Zunahme der Adhäsion verglichen mit TNF- α im Flussversuch mit HUVEC (s. Abb. 22). Somit wird die proinflammatorische Rolle v.a. von Visfatin untermauert.

Die Stimulation der RASF mit den Glukokortikoiden reduzierte die Zahl der adhären- den RASF an die HUVECs (s. Abb. 23). Die Glukokortikoide haben vermutlich einen Einfluss auf die Adhäsionsmoleküle bzw. auf die Interaktion der Adhäsionsmoleküle, wodurch vor allem die initialen Schritte der Pathogenese der RA beeinflusst werden (s. Abb. 3).

Über die Rolle von Methotrexat bei der Interaktion von RASF und EC kann keine ein- deutige Aussage getätigt werden, da sich die Einzelergebnisse stärker unterschieden und weitere Untersuchungen notwendig sind.

4.4 Einfluss des Fettgewebes auf die RA und therapeutische Konsequenz

Das weiße Fettgewebe spielt bei entzündlichen Prozessen nicht nur eine passive Rolle, sondern beeinflusst auch aktiv das Immunsystem. Patienten mit einem metabolischen Syndrom weisen serologisch niedrigschwellig erhöhte Entzündungswerte auf. Zudem konnte das metabolische Syndrom vermehrt bei Patienten mit RA nachgewiesen werden (Abella et al. 2014).

In den Expressionsanalysen konnte beobachtet werden, dass Adiponektin die mRNA- Expression von ICAM-1 der EC reduziert (s. Abb. 14). Die reduzierte Expression könnte die Bindung der durch Leukozyten und RASF exprimierten Liganden vermindern. Diese Interaktion spielt vor allem in der Adhäsionskaskade (Vestweber 2015; Ley et al. 2007) eine wichtige Rolle.

Dagegen führte die Stimulation der RASF im statischen Adhäsionstest (s. Abb. 18) zu einer gesteigerten Adhäsion der RASF an die EC. Somit fördert Adiponektin *in vitro* die Adhäsion der RASF, reduziert jedoch genauso Adhäsionsmoleküle der EC, die für die Adhäsion der RASF und Leukozyten unter anderem notwendig sind.

Im Kontext der Adipositas wird Adiponektin eine protektive Wirkung bei kardiovaskulären Erkrankungen zugesprochen; bei der RA wird vermutet, dass Adiponektin entzündungs- fördernd wirkt und direkt an der Matrixdegradation beteiligt ist (Gremese et al. 2014; Frommer et al. 2012b; Frommer et al. 2010; Ehling et al. 2006). Die Untersuchungser- gebnisse zeigten ebenfalls eine Doppelrolle von Adiponektin

Visfatin und Resistin werden proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (Brentano et al. 2007; Evans et al. 2011; Meier et al. 2012; Otero et al. 2006; Senolt et al. 2007).

Visfatin zeigte neben der Induktion der Expression von VCAM-1 (s. Abb. 12) eine Zunahme der Adhäsion im statischen und dynamischen Flussversuch mit HUVEC (s. Abb. 18 & 22). Auch Resistin führte zu einer statistisch signifikanten Steigerung der Adhäsion im statischen Adhäsionsassay. Durch die vermehrte Expression von VCAM-1 wird die Bindung an Zellen und an die EZM begünstigt. Zusätzlich erhöht die vermehrte Adhäsion der RASF an EC die Wahrscheinlichkeit für eine Migration der RASF durch das Endothel hinweg zum Entzündungsort (s. Abb. 3). Dies untermauert die entzündungsfördernde Rolle von Visfatin und Resistin im Zuge der RA. Es wurden bereits Versuche durchgeführt, um die Wirkung von Visfatin auf Leukozyten direkt zu inhibieren. Dies führte zu einer verminderten Infiltration von Leukozyten in das Synovium und einer Reduktion der Knorpeldegradation (Evans et al. 2011). Eventuell stellt eine Hemmung der Wirkung von Visfatin und Resistin eine mögliche therapeutische Option in der RA dar.

Bislang ist die Frage ungeklärt, ob die Adipokine die Entstehung entzündlicher Prozesse fördern oder eine bestehende Entzündung weiter begünstigen (Krysiak et al. 2012). Hinsichtlich der Rolle des Endothels wurden neben den HUVEC primäre EC verwendet, die aus Varizen isoliert wurden (Verwendung der primären EC im Rahmen der Expressionsanalysen und des statischen Adhäsionstests). Eine weitere Möglichkeit wäre, direkt Endothelzellen von Patienten mit RA zu isolieren. Hierfür könnten endotheliale Progenitorzellen aus dem Blut isoliert werden (Boyer et al. 2000). Dies wäre mit den Bedingungen *in vivo* eher vergleichbar. Leider können mit diesem Verfahren lediglich limitierte Zellzahlen erreicht werden.

Die Herkunft der RASF könnte auch einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse haben. Patienten reagieren unterschiedlich auf eine Therapie mit MTX (Abella et al. 2014; Oliveira et al. 2012). Die Ergebnisse der mRNA-Expression (s. Abb. 6, 8, 9, 10, 11, 12 & 13) sowie die Resultate der Flussversuche (s. Abb. 20 & 23) variierten sehr stark nach der Stimulation mit MTX, so dass dies mit der Ansprechrate auf MTX zusammenhängen könnte. Hierfür könnten zukünftig die Patientendaten hinzugezogen werden um die einzelnen Populationen in Gruppen, abhängig von der MTX-Ansprechrate, zu unterteilen.

5 Zusammenfassung

Die RA geht mit einem progredienten Befall verschiedener Gelenke einher. Es wurde gezeigt, dass RASF eine entscheidende Rolle beim Progress der Erkrankung spielen. Sie sind aktiv an der Destruktion, insbesondere des Knorpels, und der Synovitis beteiligt. Weiter besitzen RASF die Fähigkeit, über das Gefäßsystem zu wandern und somit möglicherweise weitere Gelenke oder Gelenkareale zu befallen (Lefèvre et al. 2009).

Das Fettgewebe, als endokrines und immunologisches Organ, beeinflusst verschiedene entzündliche Ereignisse. Es sezerniert unter anderem Adipokine, deren immunmodulatorisches Potential im Kontext verschiedener entzündlicher Erkrankungen bereits identifiziert wurde. Auch im Rahmen der RA zeigten die Adipokine einen vorwiegend pro-entzündlichen und pro-destruktiven Effekt (Del Prete et al. 2014; Kim et al. 2014). Ob diese Adipokine auch das Verhalten der RASF und deren Interaktion mit EC beeinflussen, war bislang noch unklar.

In dieser Arbeit konnte dargelegt werden, dass bestimmte Adipokine zu einer Steigerung der Adhäsion der RASF mit den Endothelzellen unter statischen und dynamischen Bedingungen führen. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass diese Adipokine zur Adhäsion der RASF an das Endothel beitragen und somit vor allem die initialen Schritte des Krankheitsprozesses bei der Adhäsionskaskade fördern.

Der Einsatz von Dexamethason und Prednisolon führte vor allem unter Flussbedingungen zu einer Reduktion der Adhäsionsfähigkeit der RASF an EC. Dies könnte die protektive Wirkung der eingesetzten Glukokortikoide in Rahmen der RA erklären. Interessanterweise führten die Glukokortikoide sogar zur verringerten Expression von VCAM-1 durch die RASF, wodurch die Bindung von Leukozyten beeinflusst werden könnte. Diese Reduktion führt möglicherweise zur Verringerung der Rekrutierung von Leukozyten, wodurch die Zahl von Immunzellen, die im Bereich des Synoviums gehalten werden und zum Krankheitsprozess beitragen, reduziert wird.

Durch die gezielte Blockade von Adipokinen, z.B. mittels Antikörpern, könnte der proinflammatorische Effekt bestimmter Adipokine gehemmt und auch die entzündungshemmende Wirkung von TNF- α -Blockern oder der Basismedikamente (z.B. MTX) unterstützt werden. Vermutlich ist der Effekt durch die alleinige Blockade der proinflammatorischen Adipokine aber nicht ausreichend, um eine komplette Remission der RA zu erzielen.

Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse:

Expressionsanalyse – RASF		
Gen	Stimulanz	Einfluss
Integrin α v	TNF- α	↑
	Dexamethason	↑
VCAM-1	Visfatin	↑
	Dexamethason	↓
	Prednisolon	↓

Expressionsanalyse – EC		
Gene	Stimulanz	Einfluss
ICAM-1	Adiponektin	↓
	TNF- α	↑
P-Selectin	TNF- α	↓

Statisches Adhäsionsassay – Interaktion RASF und EC	
Stimulanz	Adhäsion
Adiponektin	↑
Visfatin	↑
Resistin	↑
TNF- α	↑

Flussversuch – Interaktion RASF und E-Selectin	
Stimulanz	Adhäsion
Visfatin	↑

Flussversuch – Interaktion RASF und HUVEC	
Stimulanz	Adhäsion
Visfatin	↑
TNF- α	↑
Dexamethason	↓
Prednisolon	↓

Summary

In the cause of RA, an increasing number of joints becomes affected, inflamed and finally destroyed. It could be demonstrated that synovial fibroblasts play a crucial role in the progression of the disease. They are involved in the destruction of the joints and have the ability to migrate through the vasculature and to spread to other joints. Adipose tissue, as an endocrine and immunological organ, has an influence on various inflammatory processes. It also secretes adipokines. The role of adipokines in inflammatory diseases is not fully understood yet. In the context of RA, the adipokines seem to have a negative effect (Kim et al. 2014; Del Prete et al. 2014). However, the role of adipokines on interaction of RASF and EC has not been analysed before.

In this project, we could show that certain adipokines lead to an increase in the adhesion of RASF to EC under static and dynamic conditions.

This result suggests that distinct adipokines promote the adhesion of RASF to the endothelium and thus primarily promote the initial steps of the disease process in the context of the adhesion cascade. The use of dexamethasone and prednisolone resulted in a reduction of RASF-adhesion to EC, especially under flow conditions. This might provide an additional explanation for the protective effect of glucocorticoids, which are used in RA therapy.

Interestingly, stimulation with glucocorticoids even reduced expression of VCAM-1 by the RASF, which could affect the binding of leukocytes. This could reduce the recruitment of leukocytes, which could lead to a lower number of immune cells that are maintained in the synovium and contribute to the disease process.

Taken together the results might open new therapeutic opportunities, as for example, the effect of adipokines could be selectively blocked by antibodies. In addition, the anti-inflammatory effect of TNF- α blockers or the basic drugs (e.g., MTX) could be amplified by adipokin-blockers. In contrast, the blockage of a single proinflammatory adipokines is most likely not sufficient to achieve a complete remission of RA, but is worth to consider the combination of the blockade of proinflammatory adipokines and anti-rheumatic drugs.

6 Literaturverzeichnis

Abbassi, O.; Kishimoto, T. K.; McIntire, L. V.; Anderson, D. C.; Smith, C. W. (1993): E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow (92). In: *The Journal of clinical investigation* (6), S. 2719–2730.

Abella, V.; Scotece, M.; Conde, J.; López, V.; Lazzaro, V.; Pino, J. et al. (2014): Adipokines, metabolic syndrome and rheumatic diseases (2014). In: *Journal of immunology research*, S. 343746.

Ahmed, S.; Riegsecker, S.; Beamer, M.; Rahman, A.; Bellini, J. V.; Bhansali, P.; Tillekeratne, L. M. V. (2013): Largazole, a class I histone deacetylase inhibitor, enhances TNF- α -induced ICAM-1 and VCAM-1 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (270). In: *Toxicology and applied pharmacology* (2), S. 87–96.

Al Hannan, F.; Culligan, K. G. (2015): Human resistin and the RELM of Inflammation in diabetes (7). In: *Diabetology & metabolic syndrome*, S. 54.

Alves, C. S.; Burdick, M. M.; Thomas, S. N.; Pawar, P.; Konstantopoulos, K. (2008): The dual role of CD44 as a functional P-selectin ligand and fibrin receptor in colon carcinoma cell adhesion (294). In: *American journal of physiology. Cell physiology* (4), C907-16.

Ando, J.; Yamamoto, K. (2009): Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress (73). In: *Circulation journal: Official journal of the Japanese Circulation Society* (11), S. 1983–1992.

Ariel, A.; Lider, O.; Brill, A.; Cahalon, L.; Savion, N.; Varon, D.; HersHKoviz, R. (2000): Induction of interactions between CD44 and hyaluronic acid by a short exposure of human T cells to diverse pro-inflammatory mediators (100). In: *Immunology* (3), S. 345–351.

Arita, Y.; Kihara, S.; Ouchi, N.; Takahashi, M.; Maeda, K.; Miyagawa, J.-i. et al. (2012): Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. 1999 (425). In: *Biochemical and biophysical research communications* (3), S. 560–564.

Banerjee, R. R.; Lazar, M. A. (2001): Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine (276). In: *The Journal of biological chemistry* (28), S. 25970–25973.

Bevilacqua, M. P.; Pober, J. S.; Mendrick, D. L.; Cotran, R. S.; Gimbrone, M. A. (1987): Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule (84). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (24), S. 9238–9242.

Bitensky, L.; Cashman, B.; Johnstone, J. J.; Chayen, J. (1977): Effect of glucocorticoids on the hexose monophosphate pathway in human rheumatoid synovial lining cells in vitro and in vivo (36). In: *Annals of the rheumatic diseases* (5), S. 448–452.

Bokarewa, M.; Nagaev, I.; Dahlberg, L.; Smith, U.; Tarkowski, A. (2005): Resistin, an Adipokine with Potent Proinflammatory Properties (174). In: *The Journal of Immunology* (9), S. 5789–5795.

Bombara, M. P.; Webb, D. L.; Conrad, P.; Marlor, C. W.; Sarr, T.; Ranges, G. E. et al. (1993): Cell contact between T cells and synovial fibroblasts causes induction of adhesion molecules and cytokines (54). In: *Journal of leukocyte biology* (5), S. 399–406.

Boyer, M.; Townsend, L. E.; Vogel, L. M.; Falk, J.; Reitz-Vick, D.; Trevor, K. T. et al. (2000): Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood (31). In: *Journal of vascular surgery* (1 Pt 1), S. 181–189.

Bramlage, C. P.; Kaps, C.; Ungethüm, U.; Bramlage, P.; Koziolok, M.; Wessels, J. et al. (2008): Modulatory effects of inflammation and therapy on GDF-5 expression in rheumatoid arthritis synovium (37). In: *Scandinavian journal of rheumatology* (6), S. 401–409.

Brentano, F.; Schorr, O.; Ospelt, C.; Stanczyk, J.; Gay, R. E.; Gay, S.; Kyburz, D. (2007): Pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin, a new marker of inflammation in rheumatoid arthritis with proinflammatory and matrix-degrading activities (56). In: *Arthritis and rheumatism* (9), S. 2829–2839.

Butcher, E. C.; Picker, L. J. (1996): Lymphocyte Homing and Homeostasis (272). In: *Science* (5258), S. 60–67.

Cadherins (2008). In: Stefan Offermanns und Walter Rosenthal (Hg.): *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 306.

Campbell, I. D.; Humphries, M. J. (2011): Integrin structure, activation, and interactions (3). In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (3).

Carlos, T. M.; Harlan, J. M. (1994): Leukocyte-endothelial adhesion molecules (84). In: *Blood* (7), S. 2068–2101.

- Catalán, V.; Gómez-Ambrosi, J.; Rodríguez, A.; Ramírez, B.; Silva, C.; Rotellar, F. et al. (2011): Association of increased visfatin/PBEF/NAMPT circulating concentrations and gene expression levels in peripheral blood cells with lipid metabolism and fatty liver in human morbid obesity (21). In: *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD* (4), S. 245–253.
- Chang, S. K.; Gu, Z.; Brenner, M. B. (2010): Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11 (233). In: *Immunological reviews* (1), S. 256–266.
- Chang, S. K.; Noss, E. H.; Chen, M.; Gu, Z.; Townsend, K.; Grenha, R. et al. (2011): Cadherin-11 regulates fibroblast inflammation (108). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (20), S. 8402–8407.
- Chen, M.-P.; Chung, F.-M.; Chang, D.-M.; Tsai, J. C.-R.; Huang, H.-F.; Shin, S.-J.; Lee, Y.-J. (2006): Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus (91). In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* (1), S. 295–299.
- Chen, X.; Lu, J.; Bao, J.; Guo, J.; Shi, J.; Wang, Y. (2013): Adiponectin: a biomarker for rheumatoid arthritis? (24). In: *Cytokine & growth factor reviews* (1), S. 83–89.
- Chen, X.; Oppenheim, J. J.; Howard, O. M. Z. (2004): Chemokines and chemokine receptors as novel therapeutic targets in rheumatoid arthritis (RA): inhibitory effects of traditional Chinese medicinal components (1). In: *Cellular & molecular immunology* (5), S. 336–342.
- Chin, J. E.; Winterrowd, G. E.; Krzesicki, R. F.; Sanders, M. E. (1990): Role of cytokines in inflammatory synovitis. The coordinate regulation of intercellular adhesion molecule 1 and HLA class I and class II antigens in rheumatoid synovial fibroblasts (33). In: *Arthritis and rheumatism* (12), S. 1776–1786.
- Choi, H.-M.; Lee, Y.-A.; Lee, S.-H.; Hong, S.-J.; Hahm, D.-H.; Choi, S.-Y. et al. (2009): Adiponectin may contribute to synovitis and joint destruction in rheumatoid arthritis by stimulating vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-1, and matrix metalloproteinase-13 expression in fibroblast-like synoviocytes more than proinflammatory mediators (11). In: *Arthritis research & therapy* (6), R161.
- Choy, E. H.; Panayi, G. S. (2001): Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis (344). In: *The New England journal of medicine* (12), S. 907–916.
- Cnop, M.; Havel, P. J.; Utzschneider, K. M.; Carr, D. B.; Sinha, M. K.; Boyko, E. J. et al. (2003): Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and

plasma lipoproteins. Evidence for independent roles of age and sex (46). In: *Diabetologia* (4), S. 459–469.

Croft, D. R.; Dall, P.; Davies, D.; Jackson, D. G.; McIntyre, P.; Kramer, I. M. (1997): Complex CD44 splicing combinations in synovial fibroblasts from arthritic joints (27). In: *European journal of immunology* (7), S. 1680–1684.

Curat, C. A.; Wegner, V.; Sengenès, C.; Miranville, A.; Tonus, C.; Busse, R.; Bouloumié, A. (2006): Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin (49). In: *Diabetologia* (4), S. 744–747.

Dahl, T. B.; Yndestad, A.; Skjelland, M.; Øie, E.; Dahl, A.; Michelsen, A. et al. (2007): Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization (115). In: *Circulation* (8), S. 972–980.

Darrietort-Laffite, C.; Boutet, M.-A.; Chatelais, M.; Brion, R.; Blanchard, F.; Heymann, D.; Le Goff, B. (2014): IL-1 β and TNF α promote monocyte viability through the induction of GM-CSF expression by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (2014). In: *Mediators of inflammation*, S. 241840.

DeGrendele, H. C. (1997): Requirement for CD44 in Activated T Cell Extravasation into an Inflammatory Site (278). In: *Science* (5338), S. 672–675.

Del Prete, A.; Salvi, V.; Sozzani, S. (2014): Adipokines as potential biomarkers in rheumatoid arthritis (2014). In: *Mediators of inflammation*, S. 425068.

Diarra, D.; Stolina, M.; Polzer, K.; Zwerina, J.; Ominsky, M. S.; Dwyer, D. et al. (2007): Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling (13). In: *Nature medicine* (2), S. 156–163.

Dimitroff, C. J.; Lee, J. Y.; Rafii, S.; Fuhlbrigge, R. C.; Sackstein, R. (2001): Cd44 Is a Major E-Selectin Ligand on Human Hematopoietic Progenitor Cells (153). In: *The Journal of Cell Biology* (6), S. 1277–1286.

Doré, M.; Sirois, J. (1996): Regulation of P-selectin expression by inflammatory mediators in canine jugular endothelial cells (33). In: *Veterinary pathology* (6), S. 662–671.

Dunky, Attila (Hg.) (2012): *Praktische Rheumatologie*. 5., aktualisierte und erw. Aufl. Wien: Springer.

- Ehling, A.; Schäffler, A.; Herfarth, H.; Tarner, I. H.; Anders, S.; Distler, O. et al. (2006): The potential of adiponectin in driving arthritis (176). In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* (7), S. 4468–4478.
- Eisinger, K.; Bauer, S.; Schaffler, A.; Walter, R.; Neumann, E.; Buechler, C. et al. (2012): Chemerin induces CCL2 and TLR4 in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis (92). In: *Experimental and molecular pathology* (1), S. 90–96.
- Evans, L.; Williams, A. S.; Hayes, A. J.; Jones, S. A.; Nowell, M. (2011): Suppression of leukocyte infiltration and cartilage degradation by selective inhibition of pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase: Apo866-mediated therapy in human fibroblasts and murine collagen-induced arthritis (63). In: *Arthritis and rheumatism* (7), S. 1866–1877.
- Ezoe, K.; Horikoshi, T. (1993): Tumor necrosis factor-alpha increased the integrin alpha 2 beta 1 expression and cell attachment to type I collagen in human dermal fibroblasts (192). In: *Biochemical and biophysical research communications* (1), S. 281–287.
- Fantuzzi, G. (2008): Adiponectin and inflammation: consensus and controversy (121). In: *The Journal of allergy and clinical immunology* (2), S. 326–330.
- Fearon, U.; Griosios, K.; Fraser, A.; Reece, R.; Emery, P.; Jones, P. F.; Veale, D. J. (2003): Angiopoietins, growth factors, and vascular morphology in early arthritis (30). In: *The Journal of rheumatology* (2), S. 260–268.
- Ferraz-Amaro, I.; González-Juanatey, C.; López-Mejias, R.; Riancho-Zarrabeitia, L.; González-Gay, M. A. (2013): Metabolic syndrome in rheumatoid arthritis (2013). In: *Mediators of inflammation*, S. 710928.
- Firestein, G. S. (1996): Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? (39). In: *Arthritis & Rheumatism* (11), S. 1781–1790.
- Friebe, D.; Neef, M.; Kratzsch, J.; Erbs, S.; Dittrich, K.; Garten, A. et al. (2011): Leucocytes are a major source of circulating nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)/pre-B cell colony (PBEF)/visfatin linking obesity and inflammation in humans (54). In: *Diabetologia* (5), S. 1200–1211.
- Frommer, K. W.; Geyer, M.; Firestein, G. S. (2012a): Intracellular signaling transduction pathways. Potential targets in the treatment of rheumatic diseases (71). In: *Zeitschrift für Rheumatologie* (6), S. 460–467.

Frommer, K. W.; Schäffler, A.; Büchler, C.; Steinmeyer, J.; Rickert, M.; Rehart, S. et al. (2012b): Adiponectin isoforms: a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis? (71). In: *Annals of the rheumatic diseases* (10), S. 1724–1732.

Frommer, K. W.; Zimmermann, B.; Meier, F. M. P.; Schroder, D.; Heil, M.; Schaffler, A. et al. (2010): Adiponectin-mediated changes in effector cells involved in the pathophysiology of rheumatoid arthritis (62). In: *Arthritis and rheumatism* (10), S. 2886–2899.

Giles, J. T.; Allison, M.; Bingham, C. O.; Scott, W. M.; Bathon, J. M. (2009): Adiponectin is a mediator of the inverse association of adiposity with radiographic damage in rheumatoid arthritis (61). In: *Arthritis and rheumatism* (9), S. 1248–1256.

Glantz, M. J.; Cole, B. F.; Recht, L.; Akerley, W.; Mills, P.; Saris, S. et al. (1998): High-dose intravenous methotrexate for patients with nonleukemic leptomeningeal cancer. Is intrathecal chemotherapy necessary? (16). In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* (4), S. 1561–1567.

Gossye, V.; Elewaut, D.; Bougarne, N.; Bracke, D.; van Calenbergh, S.; Haegeman, G.; Bosscher, K. de (2009): Differential mechanism of NF-kappaB inhibition by two glucocorticoid receptor modulators in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (60). In: *Arthritis and rheumatism* (11), S. 3241–3250.

Gotsch, U.; Jäger, U.; Dominis, M.; Vestweber, D. (1994): Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo (2). In: *Cell adhesion and communication* (1), S. 7–14.

Gremese, E.; Ferraccioli, G. (2011): The metabolic syndrome: the crossroads between rheumatoid arthritis and cardiovascular risk (10). In: *Autoimmunity reviews* (10), S. 582–589.

Gremese, E.; Tulusso, B.; Gigante, M. R.; Ferraccioli, G. (2014): Obesity as a risk and severity factor in rheumatic diseases (autoimmune chronic inflammatory diseases) (5). In: *Frontiers in immunology*, S. 576.

Halbleib, J. M.; Nelson, W. J. (2006): Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis (20). In: *Genes & development* (23), S. 3199–3214.

Häupl, T.; Yahyawi, M.; Lübke, C.; Ringe, J.; Rohrlach, T.; Burmester, G. R. et al. (2007): Gene expression profiling of rheumatoid arthritis synovial cells treated with anti-rheumatic drugs (12). In: *Journal of biomolecular screening* (3), S. 328–340.

Haynes, B. F.; Hale, L. P.; Patton, K. L.; Martin, M. E.; McCallum, R. M. (1991): Measurement of an adhesion molecule as an indicator of inflammatory disease activity. Up-

regulation of the receptor for hyaluronate (CD44) in rheumatoid arthritis (34). In: *Arthritis and rheumatism* (11), S. 1434–1443.

Hochberg, M. C.; Silman, A. J.; Smolen, J. S.; Weinblatt, M. E.; Weisman, M. H. (2015): *Rheumatology*. 6. ed., 1. print. Philadelphia, Pa.: Mosby Elsevier.

Hopkins, T. A.; Ouchi, N.; Shibata, R.; Walsh, K. (2007): Adiponectin actions in the cardiovascular system (74). In: *Cardiovascular research* (1), S. 11–18.

Howe, L. R.; Subbaramaiah, K.; Hudis, C. A.; Dannenberg, A. J. (2013): Molecular pathways: adipose inflammation as a mediator of obesity-associated cancer (19). In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* (22), S. 6074–6083.

Huhtala, P. (1995): Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin (129). In: *The Journal of Cell Biology* (3), S. 867–879.

J. A. Koedman; E. M. Cramer; E. Briend; B. Furie; B. C. Furie; D. D. Wagner (1992): P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulated secretory pathway in AtT-20 cells (116). In: *The Journal of Cell Biology* (3), S. 617–625.

Jacques, C.; Holzenberger, M.; Mladenovic, Z.; Salvat, C.; Pecchi, E.; Berenbaum, F.; Gosset, M. (2012): Proinflammatory actions of visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) involve regulation of insulin signaling pathway and Nampt enzymatic activity (287). In: *The Journal of biological chemistry* (18), S. 15100–15108.

Janeway, C. A.; Travers, P. (2005): *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 6. ed. New York: Garland Science.

Kawanami, D.; Maemura, K.; Takeda, N.; Harada, T.; Nojiri, T.; Imai, Y. et al. (2004): Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells. A new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions (314). In: *Biochemical and biophysical research communications* (2), S. 415–419.

Khew-Goodall, Y.; Wadham, C.; Stein, B. N.; Gamble, J. R.; Vadas, M. A. (1999): Stat6 activation is essential for interleukin-4 induction of P-selectin transcription in human umbilical vein endothelial cells (19). In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* (6), S. 1421–1429.

Kiener, H. P.; Karonitsch, T. (2011): The synovium as a privileged site in rheumatoid arthritis: cadherin-11 as a dominant player in synovial pathology (25). In: *Best practice & research. Clinical rheumatology* (6), S. 767–777.

- Kiener, H. P.; Lee, D. M.; Agarwal, S. K.; Brenner, M. B. (2006): Cadherin-11 induces rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes to form lining layers in vitro (168). In: *The American journal of pathology* (5), S. 1486–1499.
- Kim, K. S.; Choi, H.-M.; Ji, H.-I.; Song, R.; Yang, H.-I.; Lee, S.-K. et al. (2014): Serum adipokine levels in rheumatoid arthritis patients and their contributions to the resistance to treatment (9). In: *Molecular medicine reports* (1), S. 255–260.
- Kitahara, K.; Kusunoki, N.; Kakiuchi, T.; Suguro, T.; Kawai, S. (2009): Adiponectin stimulates IL-8 production by rheumatoid synovial fibroblasts (378). In: *Biochemical and biophysical research communications* (2), S. 218–223.
- Klimiuk, P. A.; Sierakowski, S.; Domyslawska, I.; Fiedorczyk, M.; Chwiecko, J. (2004): Reduction of soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1, and sE-selectin) and vascular endothelial growth factor levels in serum of rheumatoid arthritis patients following multiple intravenous infusions of infliximab (52). In: *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* (1), S. 36–42.
- Koch, A. E.; Burrows, J. C.; Haines, G. K.; Carlos, T. M.; Harlan, J. M.; Leibovich, S. J. (1991): Immunolocalization of endothelial and leukocyte adhesion molecules in human rheumatoid and osteoarthritic synovial tissues (64). In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* (3), S. 313–320.
- Krysiak, R.; Handzlik-Orlik, G.; Okopien, B. (2012): The role of adipokines in connective tissue diseases (51). In: *European journal of nutrition* (5), S. 513–528.
- Kumada, M.; Kihara, S.; Ouchi, N.; Kobayashi, H.; Okamoto, Y.; Ohashi, K. et al. (2004): Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages (109). In: *Circulation* (17), S. 2046–2049.
- Kunkel, E. J.; Butcher, E. C. (2003): Plasma-cell homing (3). In: *Nature reviews. Immunology* (10), S. 822–829.
- Kusunoki, N.; Kitahara, K.; Kojima, F.; Tanaka, N.; Kaneko, K.; Endo, H. et al. (2010): Adiponectin stimulates prostaglandin E(2) production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (62). In: *Arthritis and rheumatism* (6), S. 1641–1649.
- Lafyatis, R.; Remmers, E. F.; Roberts, A. B.; Yocum, D. E.; Sporn, M. B.; Wilder, R. L. (1989): Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids (83). In: *The Journal of clinical investigation* (4), S. 1267–1276.

- Lago, F.; Dieguez, C.; Gómez-Reino, J.; Gualillo, O. (2007): Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation (3). In: *Nature clinical practice. Rheumatology* (12), S. 716–724.
- Lange, U. (2015): Q9: Klinische Pharmakologie/Pharmakotherapie kursbegleitendes Skript zum Thema "Therapie der rheumatoiden Arthritis", 24.Auflage.
- Lee, D. M.; Kiener, H. P.; Agarwal, S. K.; Noss, E. H.; Watts, G. F. M.; Chisaka, O. et al. (2007): Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis (315). In: *Science* (5814), S. 1006–1010.
- Lee, D. M.; Weinblatt, M. E. (2001): Rheumatoid arthritis (358). In: *Lancet (London, England)* (9285), S. 903–911.
- Lee, W.-J.; Wu, C.-S.; Lin, H.; Lee, I.-T.; Wu, C.-M.; Tseng, J.-J. et al. (2009): Visfatin-induced expression of inflammatory mediators in human endothelial cells through the NF-kappaB pathway (33). In: *International journal of obesity (2005)* (4), S. 465–472.
- Lefèvre, S.; Knedla, A.; Tennie, C.; Kampmann, A.; Wunrau, C.; Dinser, R. et al. (2009): Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints (15). In: *Nature medicine* (12), S. 1414–1420.
- Ley, K.; Laudanna, C.; Cybulsky, M. I.; Nourshargh, S. (2007): Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated (7). In: *Nature reviews. Immunology* (9), S. 678–689.
- Lin, F.; Juan, Y.; Zheng, S.-E.; Shen, Z.; Tang, L.-N.; Zhao, H.; Yao, Y. (2009): Relationship of serum methotrexate concentration in high-dose methotrexate chemotherapy to prognosis and tolerability. A prospective cohort study in chinese adults with osteosarcoma (70). In: *Current therapeutic research, clinical and experimental* (2), S. 150–160.
- Littler, A. J.; Buckley, C. D.; Wordsworth, P.; Collins, I.; Martinson, J.; Simmons, D. L. (1997): A distinct profile of six soluble adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectin, L-selectin and P-selectin) in rheumatoid arthritis (36). In: *British journal of rheumatology* (2), S. 164–169.
- Liu, Z.; Miner, J. J.; Yago, T.; Yao, L.; Lupu, F.; Xia, L.; McEver, R. P. (2010): Differential regulation of human and murine P-selectin expression and function in vivo (207). In: *The Journal of experimental medicine* (13), S. 2975–2987.
- Looney, R. J. (2006): B cell-targeted therapy for rheumatoid arthritis: an update on the evidence (66). In: *Drugs* (5), S. 625–639.

- Lowin, T.; Straub, R. H. (2011): Integrins and their ligands in rheumatoid arthritis (13). In: *Arthritis research & therapy* (5), S. 244.
- Lowin, T.; Straub, R. H. (2015): Synovial fibroblasts integrate inflammatory and neuro-endocrine stimuli to drive rheumatoid arthritis (11). In: *Expert review of clinical immunology* (10), S. 1069–1071.
- Lowin, T.; Straub, R. H.; Neumann, E.; Bosserhoff, A.; Vogel, C.; Moissl, C. et al. (2009): Glucocorticoids increase alpha5 integrin expression and adhesion of synovial fibroblasts but inhibit ERK signaling, migration, and cartilage invasion (60). In: *Arthritis and rheumatism* (12), S. 3623–3632.
- Luzzatto, L.; Pandolfi, P. P. (2015): Causality and Chance in the Development of Cancer (373). In: *The New England journal of medicine* (1), S. 84–88.
- Ma, Y.; Pope, R. M. (2005): The role of macrophages in rheumatoid arthritis (11). In: *Current pharmaceutical design* (5), S. 569–580.
- Majumdar, S.; Aggarwal, B. B. (2001): Methotrexate Suppresses NF- B Activation Through Inhibition of I B Phosphorylation and Degradation (167). In: *The Journal of Immunology* (5), S. 2911–2920.
- Marlor, C. W.; Webb, D. L.; Bombara, M. P.; Greve, J. M.; Blue, M. (1992): Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in fibroblastlike synoviocytes after stimulation with tumor necrosis factor. In: *Am. J. Pathol.* (140), S. 1055–1060.
- Martini, L. (2004): Encyclopedia of endocrine diseases. Amsterdam u.a.: Elsevier Acad. Press.
- McGarry, T.; Veale, D. J.; Gao, W.; Orr, C.; Fearon, U.; Connolly, M. (2015): Toll-like receptor 2 (TLR2) induces migration and invasive mechanisms in rheumatoid arthritis (17). In: *Arthritis research & therapy*, S. 153.
- McInnes, I. B.; Schett, G. (2011): The pathogenesis of rheumatoid arthritis (365). In: *The New England journal of medicine* (23), S. 2205–2219.
- Meier, F. M. P.; Frommer, K. W.; Peters, M. A.; Brentano, F.; Lefèvre, S.; Schröder, D. et al. (2012): Visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF), a proinflammatory and cell motility-changing factor in rheumatoid arthritis (287). In: *The Journal of biological chemistry* (34), S. 28378–28385.
- Mikecz, K.; Brennan, F. R.; Kim, J. H.; Glant, T. T. (1995): Anti-CD44 treatment abrogates tissue oedema and leukocyte infiltration in murine arthritis (1). In: *Nature medicine* (6), S. 558–563.

- Mitroulis, I.; Alexaki, V. I.; Kourtzelis, I.; Ziogas, A.; Hajishengallis, G.; Chavakis, T. (2015): Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease (147). In: *Pharmacology & therapeutics*, S. 123–135.
- Moschen, A. R.; Kaser, A.; Enrich, B.; Mosheimer, B.; Theurl, M.; Niederegger, H.; Tilg, H. (2007): Visfatin, an Adipocytokine with Proinflammatory and Immunomodulating Properties (178). In: *The Journal of Immunology* (3), S. 1748–1758.
- Muller, W. A. (2013): Getting leukocytes to the site of inflammation (50). In: *Veterinary pathology* (1), S. 7–22.
- Naor, D.; Nedvetzki, S. (2003): CD44 in rheumatoid arthritis (5). In: *Arthritis Res Ther* (3), S. 105.
- Naor, D.; Nedvetzki, S.; Golan, I.; Melnik, L.; Faitelson, Y. (2002): CD44 in cancer (39). In: *Critical reviews in clinical laboratory sciences* (6), S. 527–579.
- Naor, D.; Sionov, R. V.; Ish-Shalom, D. (1997): CD44. Structure, function, and association with the malignant process (71). In: *Advances in cancer research*, S. 241–319.
- Navarro-Hernández, R. E.; Oregon-Romero, E.; Vázquez-Del Mercado, M.; Rangel-Villalobos, H.; Palafox-Sánchez, C. A.; Muñoz-Valle, J. F. (2009): Expression of ICAM1 and VCAM1 serum levels in rheumatoid arthritis clinical activity. Association with genetic polymorphisms (26). In: *Disease markers* (3), S. 119–126.
- Nedvetzki, S.; Walmsley, M.; Alpert, E.; Williams, R. O.; Feldmann, M.; Naor, D. (1999): CD44 involvement in experimental collagen-induced arthritis (CIA) (13). In: *Journal of autoimmunity* (1), S. 39–47.
- Neidhart, M.; Zaucke, F.; Knoch, R. von; Jüngel, A.; Michel, B. A.; Gay, R. E.; Gay, S. (2005): Galectin-3 is induced in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after adhesion to cartilage oligomeric matrix protein (64). In: *Annals of the rheumatic diseases* (3), S. 419–424.
- Neumann, E.; Lefèvre, S.; Zimmermann, B.; Gay, S.; Müller-Ladner, U. (2010a): Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts (16). In: *Trends in molecular medicine* (10), S. 458–468.
- Neumann, E.; Lefèvre, S.; Zimmermann, B.; Geyer, M.; Lehr, A.; Umscheid, T. et al. (2010b): Migratory potential of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: additional perspectives (9). In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* (12), S. 2286–2291.

- Nissen, S. E.; Yeomans, N. D.; Solomon, D. H.; Lüscher, T. F.; Libby, P.; Husni, M. E. et al. (2016): Cardiovascular Safety of Celecoxib, Naproxen, or Ibuprofen for Arthritis (375). In: *The New England journal of medicine* (26), S. 2519–2529.
- Oliveira, R. D. R.; Fontana, V.; Junta, C. M.; Marques, M. M. C.; Macedo, C.; Rassi, D. M. et al. (2012): Differential gene expression profiles may differentiate responder and nonresponder patients with rheumatoid arthritis for methotrexate (MTX) monotherapy and MTX plus tumor necrosis factor inhibitor combined therapy (39). In: *The Journal of rheumatology* (8), S. 1524–1532.
- Otero, M.; Lago, R.; Gomez, R.; Lago, F.; Dieguez, C.; Gómez-Reino, J. J.; Gualillo, O. (2006): Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis (65). In: *Annals of the rheumatic diseases* (9), S. 1198–1201.
- Ouchi, N.; Kihara, S.; Arita, Y.; Nishida, M.; Matsuyama, A.; Okamoto, Y. et al. (2001): Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages (103). In: *Circulation* (8), S. 1057–1063.
- Ozgen, M.; Koca, S. S.; Dagli, N.; Balin, M.; Ustundag, B.; Isik, A. (2010): Serum adiponectin and vaspin levels in rheumatoid arthritis (41). In: *Archives of medical research* (6), S. 457–463.
- Pap, T.; Müller-Ladner, U.; Gay, R. E.; Gay, S. (2000): Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (2). In: *Arthritis research* (5), S. 361–367.
- Park, Y.-E.; Woo, Y.-J.; Park, S.-H.; Moon, Y.-M.; Oh, H.-J.; Kim, J.-I. et al. (2011): IL-17 increases cadherin-11 expression in a model of autoimmune experimental arthritis and in rheumatoid arthritis (140). In: *Immunology letters* (1-2), S. 97–103.
- Procaccini, C.; Rosa, V. de; Galgani, M.; Carbone, F.; La Rocca, C.; Formisano, L.; Matarese, G. (2013): Role of adipokines signaling in the modulation of T cells function (4). In: *Frontiers in immunology*, S. 332.
- Rheumastiftung (2015): Geschichte der Rheumatherapie. Online verfügbar unter http://www.rheumastiftung.org/fileadmin/rheumastiftung/pdf/Geschichte_der_Rheumatherapie_3_doc.pdf.
- Rho, Y. H.; Solus, J.; Sokka, T.; Oeser, A.; Chung, C. P.; Gebretsadik, T. et al. (2009): Adipocytokines are associated with radiographic joint damage in rheumatoid arthritis (60). In: *Arthritis and rheumatism* (7), S. 1906–1914.

- Richter, U.; Schroder, C.; Wicklein, D.; Lange, T.; Geleff, S.; Dippel, V. et al. (2011): Adhesion of small cell lung cancer cells to E- and P-selectin under physiological flow conditions: implications for metastasis formation (135). In: *Histochemistry and cell biology* (5), S. 499–512.
- Rinaldi, N.; Schwarz-Eywill, M.; Weis, D.; Leppelmann-Jansen, P.; Lukoschek, M.; Keilholz, U.; Barth, T. F. (1997): Increased expression of integrins on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis in vitro correlates with enhanced binding to extracellular matrix proteins (56). In: *Annals of the rheumatic diseases* (1), S. 45–51.
- Sarkissian, M.; Lafyatis, R. (1999): Integrin engagement regulates proliferation and collagenase expression of rheumatoid synovial fibroblasts (162). In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* (3), S. 1772–1779.
- Savage, D. B.; Sewter, C. P.; Klenk, E. S.; Segal, D. G.; Vidal-Puig, A.; Considine, R. V.; O'Rahilly, S. (2001): Resistin/ Fizz3 Expression in Relation to Obesity and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Action in Humans (50). In: *Diabetes* (10), S. 2199–2202.
- Schäffler, A.; Ehling, A.; Neumann, E.; Herfarth, H.; Tarner, I.; Schölmerich, J. et al. (2003): Adipocytokines in synovial fluid (290). In: *JAMA* (13), S. 1709–1710.
- Schönfeld, C.; Pap, T.; Neumann, E.; Müller-Ladner, U. (2015): Fibroblasten als pathogene Zellen in der rheumatischen Entzündung (74). In: *Zeitschrift für Rheumatologie* (1), S. 33–38.
- Scott, D. L.; Wolfe, F.; Huizinga, T. W. J. (2010): Rheumatoid arthritis (376). In: *Lancet (London, England)* (9746), S. 1094–1108.
- Senolt, L.; Housa, D.; Vernerová, Z.; Jirásek, T.; Svobodová, R.; Veigl, D. et al. (2007): Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum (66). In: *Annals of the rheumatic diseases* (4), S. 458–463.
- Shibata, R.; Murohara, T.; Ouchi, N. (2012): Protective role of adiponectin in cardiovascular disease (19). In: *Current medicinal chemistry* (32), S. 5459–5466.
- Shigeyama, Y.; Pap, T.; Kunzler, P.; Simmen, B. R.; Gay, R. E.; Gay, S. (2000): Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis (43). In: *Arthritis and rheumatism* (11), S. 2523–2530.
- Springer, T. A. (1995): Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration (57). In: *Annual review of physiology*, S. 827–872.

- Spurlock, C. F.; Gass, H. M.; Bryant, C. J.; Wells, B. C.; Olsen, N. J.; Aune, T. M. (2015): Methotrexate-mediated inhibition of nuclear factor κ B activation by distinct pathways in T cells and fibroblast-like synoviocytes (54). In: *Rheumatology (Oxford, England)* (1), S. 178–187.
- Steyers, C. M.; Miller, F. J. (2014): Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases (15). In: *International journal of molecular sciences* (7), S. 11324–11349.
- Stupack, D. G.; Puente, X. S.; Boutsaboualoy, S.; Storgard, C. M.; Cheresh, D. A. (2001): Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins (155). In: *The Journal of Cell Biology* (3), S. 459–470.
- Szekanecz, Z.; Besenyei, T.; Szentpétery, A.; Koch, A. E. (2010): Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis (22). In: *Current opinion in rheumatology* (3), S. 299–306.
- Szekanecz, Z.; Pakozdi, A.; Szentpetery, A.; Besenyei, T.; Koch, A. E. (2009): Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis (1). In: *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, S. 44–51.
- Tan, W.; Wang, F.; Zhang, M.; Guo, D.; Zhang, Q.; He, S. (2009): High adiponectin and adiponectin receptor 1 expression in synovial fluids and synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis (38). In: *Seminars in arthritis and rheumatism* (6), S. 420–427.
- Tessier, P. A.; Cattaruzzi, P.; McColl, S. R. (1996): Inhibition of lymphocyte adhesion to cytokine-activated synovial fibroblasts by glucocorticoids involves the attenuation of vascular cell adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1 gene expression (39). In: *Arthritis and rheumatism* (2), S. 226–234.
- Tishler, M.; Caspi, D.; Graff, E.; Segal, R.; Peretz, H.; Yaron, M. (1989): Synovial and serum levels of methotrexate during methotrexate therapy of rheumatoid arthritis (28). In: *British journal of rheumatology* (5), S. 422–423.
- Tong, K.-M.; Chen, C.-P.; Huang, K.-C.; Shieh, D.-C.; Cheng, H.-C.; Tzeng, C.-Y. et al. (2011): Adiponectin increases MMP-3 expression in human chondrocytes through AdipoR1 signaling pathway (112). In: *Journal of cellular biochemistry* (5), S. 1431–1440.
- Toussirot, É.; Binda, D.; Gueugnon, C.; Dumoulin, G. (2012): Adiponectin in autoimmune diseases (19). In: *Current medicinal chemistry* (32), S. 5474–5480.
- Treese, C.; Mittag, A.; Lange, F.; Tarnok, A.; Loesche, A.; Emmrich, F. et al. (2008): Characterization of fibroblasts responsible for cartilage destruction in arthritis (73). In: *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* (4), S. 351–360.

- Turner, J. D.; Filer, A. (2015): The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis pathogenesis (27). In: *Current opinion in rheumatology* (2), S. 175–182.
- van de Sande, Marleen G; Baeten, D. L. (2016): Immunopathology of synovitis: from histology to molecular pathways (55). In: *Rheumatology (Oxford, England)* (4), S. 599–606.
- van Weering, D. H.; Baas, P. D.; Bos, J. L. (1993): A PCR-based method for the analysis of human CD44 splice products (3). In: *PCR methods and applications* (2), S. 100–106.
- Vandooren, B.; Cantaert, T.; ter Borg, M.; Noordenbos, T.; Kuhlman, R.; Gerlag, D. et al. (2008): Tumor necrosis factor alpha drives cadherin 11 expression in rheumatoid inflammation (58). In: *Arthritis and rheumatism* (10), S. 3051–3062.
- Vestweber, D. (2015): How leukocytes cross the vascular endothelium (15). In: *Nature reviews. Immunology* (11), S. 692–704.
- Watts, R. A.; Conaghan, P. G.; Denton, C. (2013): Oxford Textbook of Rheumatology. 4th ed. Oxford: OUP Oxford (Oxford Textbook).
- Weller, A.; Isenmann, S.; Vestweber, D. (1992): Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha (267). In: *The Journal of biological chemistry* (21), S. 15176–15183.
- Wibulswas, A.; Croft, D.; Pitsillides, A. A.; Bacarese-Hamilton, I.; McIntyre, P.; Genot, E.; Kramer, I. M. (2002): Influence of epitopes CD44v3 and CD44v6 in the invasive behavior of fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid arthritic joints (46). In: *Arthritis and rheumatism* (8), S. 2059–2064.
- Yasuda, T. (2006): Cartilage destruction by matrix degradation products (16). In: *Modern rheumatology* (4), S. 197–205.
- Zimmermann, B. (2011): Charakterisierung der transendothelialen Migration von synovialen Fibroblasten bei der rheumatoiden Arthritis. Gießen, Justus-Liebig-Universität, Diss., 2011. Gießen: Universitätsbibliothek.
- Zou, X.; Shinde Patil, V. R.; Dagia, N. M.; Smith, L. A.; Wargo, M. J.; Interliggi, K. A. et al. (2005): PSGL-1 derived from human neutrophils is a high-efficiency ligand for endothelium-expressed E-selectin under flow (289). In: *American journal of physiology. Cell physiology* (2), S. 24.

7 Liste der zitierbaren Abstracts

Hasseli R, Oehler MP, Richter K, Meier F, Huber M, Tarner IH, Lange U, Müller-Ladner U. *Nicht immer ist es nur ein Lymphödem*. German Medical Science GMS Publishing House; 2017. DocFA.43

Tarner IH, Huber M, **Hasseli R**, Oehler M, Meier F, Hunfeld KP, Müller-Ladner U. *Die Gefahr aus der Regentonne?* German Medical Science GMS Publishing House; 2017. DocFA.04

Hasseli R, Frommer KW, Rehart S, Schönburg M, Umscheid T, Müller-Ladner U, Neumann E. *Adipokines change Adhesion of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts Adhesion to Endothelial Cells*. German Medical Science GMS Publishing House; 2016. DocER.06

Hasseli R, Frommer KW, Schönburg M, Rehart S, Müller-Ladner U, Neumann E. *Adipokines Alter the Interaction Between Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts Adhesion and Endothelial Cells [abstract]*. Arthritis Rheumatol. 2016; 68 (Suppl 10).

R Hasseli, K Frommer, T Umscheid, M Schönburg, S Rehart, U Müller-Ladner, E Neumann. A10.12 *Adipokines influence the interaction between rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and endothelial cells*. Annals of the Rheumatic Diseases 2016;75:A77.

Hasseli R, Frommer KW, Schönburg M, Rehart S, Müller-Ladner U, Neumann E. *Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts Adhesion to Endothelial Cells is changed by Stimulation with Adipokines*. Ann Rheum Dis 2016;75(Suppl2): 437

Hasseli R, Frommer KW, Umscheid T, Schönburg M, Rehart S, Müller-Ladner U, Neumann E. *Der Einfluss von Adipokinen auf die Interaktion von synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Endothelzellen*. Internist 2016 (Suppl 1) 57: S 60; P 111

Hasseli R, Frommer KW, Umscheid T, Schönburg M, Rehart S, Müller-Ladner U, Neumann E. *The Influence of Adipokines on the Interaction of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts with Endothelial Cells [abstract]*. Arthritis Rheumatol. 2015; 67 (Suppl 10).

Hasseli R, Frommer K, Zimmermann B, Rehart S, Schönburg M, Umscheid T, Müller-Ladner U, Neumann E. *Adipokines alter the interaction of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts with endothelial cells*. German Medical Science GMS Publishing House; 2015. Doc52.01 - ER.09

Hasseli R, Frommer K, Zimmermann B, Rehart S, Schönburg M, Umscheid T, Müller-Ladner U, Neumann E. *Adipokines alter the interaction of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts with endothelial cells*. Ann Rheum Dis 2015;74 (Suppl2): 170

R. Hasseli, K. Frommer, T. Umscheid, S. Rehart, M. Schönburg, U. Müller-Ladner, E. Neumann. *Adipokine verändern das Adhäsionsverhalten von synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis*. Internist 2015 (Suppl 1) 56: S 8; YIA10

8 Vorträge und Posterpräsentationen

- 06.09. –09.09.2017 Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Frankfurt
Posterpräsentation
Titel: *Nicht immer ist es nur ein Lymphödem*
- 11.11. –16.11.2016 American College of Rheumatology, Annual Meeting, Washington D.C.
Posterpräsentation
Titel: *Adipokines Alter the Interaction Between Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts and Endothelial Cells*
- 31.08. –03.09.2016 Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Frankfurt
Vortrag
Titel: *Adipokines change Adhesion of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts to Endothelial Cells*
- 08.06. –11.06.2016 European League Against Rheumatism, Annual Congress, London
Posterpräsentation
Titel: *Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts Adhesion to Endothelial Cells is Changed by Stimulation with Adipokines*
- 09.04 – 12.04.2016 Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Mannheim
Posterpräsentation
Titel: *Der Einfluss von Adipokinen auf die Interaktion von synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Endothelzellen*
- 25.02. –27.02.2016 European Workshop for Rheumatology and Research, York (GB)
Posterpräsentation
Titel: *Adipokines Influence the Interaction between Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts and Endothelial Cells*
- 06.11. –11.11.2015 American College of Rheumatology, Annual Meeting, San Francisco
Posterpräsentation
Titel: *The Influence of Adipokines on the Interaction of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts with Endothelial Cells*
- 02.09. –05.09.2015 Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Bremen
Vortrag
Titel: *Adipokines Alter the Interaction of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts with Endothelial Cells*
- 18.06. –19.06.2015 Retreat „Excellence Cluster of Cardio Pulmonary System“, Bad Nauheim
Posterpräsentation
Titel: *Influence of Adipokines on the Interaction of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts with Endothelial Cells*
- 10.06 –13.06.2015 European League Against Rheumatism, Annual Congress, Rom
Vortrag
Titel: *Adipokines Alter the Interaction of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts with Endothelial Cells*
- 18.04. –21.04.2015 Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Mannheim
Vortrag und Nominierung im Rahmen des Young Investigator Awards
Titel: *Adipokine verändern das Adhäsionsverhalten von synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis*