

# **Charakterisierung der transendothelialen Migration von synovialen Fibroblasten bei der rheumatoiden Arthritis**



**DISSERTATION**

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

vorgelegt von  
Birgit Zimmermann  
geb. am 21.09.1980  
in Prenzlau

Gießen/Bad Nauheim, 2011



**Diese Arbeit wurde von Prof. Dr. U. Müller-Ladner und Frau Dr. E. Neumann sowie für den Fachbereich 08 von Prof. Dr. M. Martin angeleitet.**

**Prüfungsausschuss:**

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Martin
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Müller-Ladner
3. Prüfer: Prof. Dr. K.T. Preissner
4. Prüfer: Prof. Dr. T.E. Trenczek

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	1
<b>1.1. Rheumatoide Arthritis</b> .....	1
<b>1.2. Osteoarthritis</b> .....	4
<b>1.3. Aufbau des Gelenks</b> .....	4
<b>1.4. RA-vermittelte Gelenkveränderungen</b> .....	5
1.4.1. Die Pannusbildung aus dem Synovium.....	6
<b>1.5. Fibroblasten</b> .....	8
1.5.1. Das Migrationspotential der RASF.....	9
<b>1.6. Gefäßsystem</b> .....	9
1.6.1. Aufbau der Gefäßwand.....	10
1.6.2. Endothelzellen.....	11
1.6.3. Thrombozyten.....	15
<b>1.7. Extrazelluläre DNS und RNS</b> .....	15
<b>1.8. SCID-Maus Modell der RA</b> .....	16
<b>1.9. Zielsetzung</b> .....	17
<b>2. MATERIAL</b> .....	18
<b>2.1. Untersuchte Organismen</b> .....	18
2.1.1. Verwendete Maus-Stämme.....	18
2.1.2. Verwendete Zellen.....	18
<b>2.2. Verwendete Chemikalien</b> .....	19
2.2.1. Verwendete Medien.....	20
2.2.2. Verwendete Lösungen.....	21
<b>2.3. Verwendete Antikörper</b> .....	22
<b>2.4. Verwendete Proteine</b> .....	23
<b>2.5. Verwendete Enzyme</b> .....	23
<b>2.6. Verwendete RA-Therapeutika</b> .....	24
<b>2.7. Verwendete Oligonukleotide (Primer)</b> .....	24
<b>2.8. Verwendete Kits</b> .....	25

---

<b>2.9. Plastikware und sonstige Materialien.....</b>	<b>25</b>
<b>2.10. Verwendete Geräte.....</b>	<b>26</b>
<b>2.11. Verwendete Software.....</b>	<b>27</b>
<b>3. METHODEN.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>28</b>
3.1.1. Entnahme der Gewebe.....	28
3.1.2. Lagerung der Gewebe.....	28
3.1.3. Isolierung und Kultur synovialer Fibroblasten.....	29
3.1.4. Isolierung und Kultur von Endothelzellen.....	30
3.1.5. Stimulierung von RASF mit DNase, RNase, DNS und RNS.....	32
<b>3.2. Färbungen.....</b>	<b>33</b>
3.2.1. Hämalaun/Eosin-Färbung (H/E Färbung).....	33
3.2.2. Kristallviolett-färbung.....	33
<b>3.3. Anfertigung von Gewebeschnitten.....</b>	<b>34</b>
<b>3.4. Zytospin.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5. Das SCID-Maus-Modell.....</b>	<b>35</b>
3.5.1. Durchführung des SCID-Maus Modells.....	35
3.5.2. Zeitverlauf der RASF-Migration im SCID-Maus Modell.....	39
3.5.3. Das SCID-Maus Modell mit E- und P-Selektin-defizienten Mäusen.....	39
3.5.4. Therapeutisch wirksame Substanzen im SCID-Maus Modell.....	40
<b>3.6. Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>41</b>
3.6.1. DNS-Isolierung.....	41
3.6.2. Polymerase-Kettenreaktion.....	41
3.6.3. Agarose-Gelelektrophorese.....	43
3.6.4. Messung der RNS im Zellkulturüberstand.....	43
<b>3.7. Immunologische Methoden.....</b>	<b>44</b>
3.7.1. Immunhisto- und immunzytochemische Färbungen.....	44
3.7.2. Immunfluoreszenz-Färbung.....	45
3.7.3. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	45
<b>3.8. Funktionelle Assays.....</b>	<b>46</b>

3.8.1. Transmigrationsassay.....	46
3.8.2. Zell-Zell-Bindungsversuch.....	48
3.8.3. Flusskammerversuch.....	48
3.8.4. Schüttelversuch.....	50
3.8.5. RNase-Aktivitätstest.....	51
<b>3.9. Statistik.....</b>	<b>51</b>
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1. Zeitverlauf der Migration im SCID-Maus Modell.....</b>	<b>52</b>
4.1.1. Zeitverlauf der RASF-Migration.....	52
4.1.2. Gefäßneubildung im SCID-Maus Modell.....	57
4.1.3. Gefäßneubildung durch RASF im Vergleich zu Kontrollfibroblasten.....	64
<b>4.2. Analyse der RASF im murinen Blut.....</b>	<b>66</b>
4.2.1. Nachweis von humanen RASF in murinem Blut.....	67
4.2.2. Nachweis von humanen RASF in murinen Milzen.....	68
4.2.3. Untersuchung der humanen DNS im murinen Blut.....	69
<b>4.3. Adhäsions- und Transmigrations-Verhalten der RASF an Endothelzellen....</b>	<b>70</b>
4.3.1. Reinheit der primären humanen Endothelzellen.....	70
4.3.2. Adhäsionsfähigkeit der RASF an verschiedene Endothelzellen.....	71
4.3.3. Analyse der RASF-Transmigration durch Endothelzellen <i>in vitro</i> .....	73
<b>4.4. Adhäsionsmoleküle in der Interaktion von RASF mit Endothelzellen.....</b>	<b>74</b>
4.4.1. Expression von CD15s auf RASF.....	74
4.4.2. Funktion von E- und P-Selektin bei der RASF-Transmigration.....	78
4.4.3. Expression von CD31 und $\alpha$ -smooth muscle actin.....	82
<b>4.5. Bindung von RASF an Thrombozyten.....</b>	<b>83</b>
4.5.1. Nachweis von murinem CD42b in den Implantaten.....	84
4.5.2. Nachweis von murinem CD42b in murinem Blut.....	85
<b>4.6. Versuche zur Inhibition der RASF-Transmigration.....</b>	<b>85</b>
4.6.1. Einfluss extrazellulärer RNS und DNS.....	86
4.6.2. Effekte von DMARDs, Biologika und eines Proteasomen-Inhibitors.....	91
<b>4.7. Perichondrozytäre Knorpeldegradation.....</b>	<b>94</b>

---

<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>95</b>
<b>5.1. Kinetik der RASF-Transmigration im SCID-Maus Modell.....</b>	<b>95</b>
5.1.1. Zeitlicher Ablauf der Transmigration im SCID-Maus Modell.....	96
<b>5.2. RASF-Interaktion mit Endothelzellen.....</b>	<b>103</b>
5.2.1. Transmigration der RASF <i>in vitro</i> .....	104
<b>5.3. Mögliche Adhäsionsmoleküle bei der Interaktion von RASF und Endothelzellen.....</b>	<b>105</b>
5.3.1. Expression von CD15s.....	105
5.3.2. Funktion von E- und P-Selektin.....	106
<b>5.4. Interaktion der RASF mit Thrombozyten.....</b>	<b>107</b>
<b>5.5. Wirkung von RNase/DNase sowie exRNS/exDNS auf RASF.....</b>	<b>109</b>
<b>5.6. Hemmung der Transmigration.....</b>	<b>110</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>111</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>113</b>
<b>8. ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>115</b>
<b>9. REFERENZEN.....</b>	<b>118</b>
<b>10. PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>129</b>
10.1. Publikationen.....	129
10.2. Vorträge und Poster.....	129
<b>11. ANHANG.....</b>	<b>134</b>

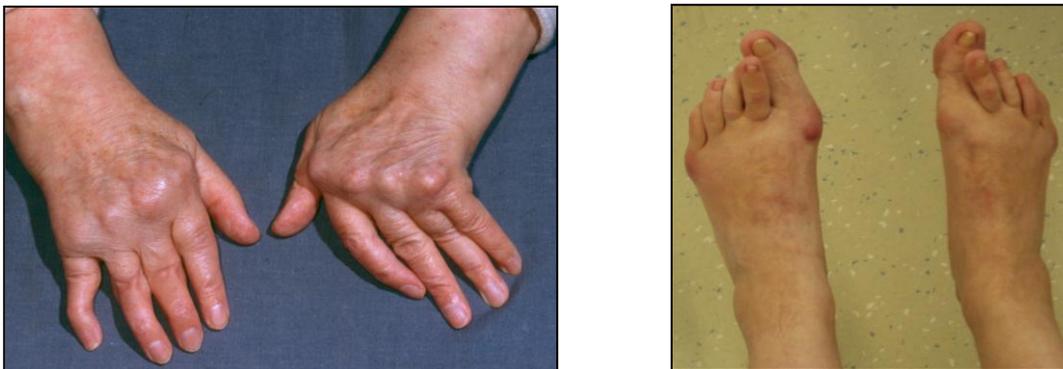
---

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Rheumatoide Arthritis

Der Begriff rheumatoide Arthritis (RA) wurde schon im Jahr 1859 von Alfred B. Garrod geprägt. Die ersten Fallbeschreibungen zur RA gab es aber bereits im Jahre 1800 von A. J. Landré-Beauvais (44). Es wird davon ausgegangen, dass circa 1% der Weltbevölkerung von der RA betroffen ist, wobei häufiger Frauen als Männer erkranken (105). Außerdem steigt das Risiko an RA zu erkranken mit dem Alter an (49). Bei der rheumatoiden Arthritis, auch chronische Polyarthritits genannt, handelt es sich um eine chronische autoimmunreaktive Bindegewebserkrankung, die insbesondere das Synovium, die Sehenscheiden und die Schleimbeutel der Gelenke betrifft (29). Es ist bisher nicht geklärt, ob die Entzündung der Auslöser für die Autoimmunreaktion ist oder ob die Autoimmunreaktion die Entzündung hervorruft (5).

Zuerst sind meistens Finger- sowie Hand- und Fußgelenke betroffen. Danach breitet sich die Entzündung symmetrisch auf den restlichen Körper aus (37). Die erste schmerzhafte entzündliche Phase klingt zunächst ab und es kommt zu einer chronischen Phase, die für die Patienten weniger schmerzhaft ist, bei der die Gelenkzerstörung jedoch fortschreitet (104). Im Verlauf dieser chronischen Phase kommt es zum wiederholten Aufflammen der Entzündung (93 und 104). Durch die entzündlichen Prozesse werden Matrix abbauende Zellen aktiviert, wodurch Knochen und Knorpel im Gelenk von den Seiten des Gelenks her abgebaut werden. Dadurch werden auch Wundheilungsprozesse und Reparaturmechanismen aktiviert. Das hat zur Folge, dass in anderen Bereichen des Gelenks *Extra Cellular Matrix* (ECM) neu gebildet wird. Über längere Zeit führen die Gelenkveränderungen des Knochenab- und -anbaus zum Funktionsverlust der betroffenen Gelenke (104) mit entsprechender Fehlstellung (siehe Abb.1).



**Abb. 1: Fehlstellungen der Hand- und Fußgelenke von Patienten mit rheumatoider Arthritis.** Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. R. Dinser, Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim.

Die Ursachen für die Entstehung einer rheumatoiden Arthritis sind nicht eindeutig geklärt. Umwelteinflüsse sowie eine genetische Präposition spielen bei der Pathogenese der RA eine wichtige Rolle (39). Außerdem wird diskutiert, ob pathogene Keime bei der Entstehung der RA von Bedeutung sind (32 und 95).

1987 wurden vom „*American College of Rheumatology*“ (ACR) die Klassifikationskriterien für die RA festgelegt. Seit dem Jahr 2010 wurden die Kriterien geändert (Tabelle 1), um auf die frühe Erkrankungsphase einzugehen (49). Bei Zutreffen von mindestens 6 Punkten liegt eine RA vor. Große Gelenke sind Schulter, Ellenbogen, Hüftgelenk, Knie und Fußknöchel. Bei kleinen Gelenken handelt es sich um Handwurzel-, Metakarpophalangeal-, proximale Interphalangeal-, und Metatarsophalangealgelenke (49).

**Tabelle 1: Übersicht über die neuen Klassifikationskriterien für die RA vom ACR (49)**

<b>ACR/EULAR-Klassifikationskriterien für die RA</b>	<b>Score</b>
<i>Gelenkbeteiligung (Synovitis)</i>	
1 großes Gelenk	0
2-10 große Gelenke	1
1-3 kleine Gelenke (mit/ohne Beteiligung von großen Gelenken)	2
4-10 kleine Gelenke (mit/ohne Beteiligung von großen Gelenken)	3
> 10 Gelenke (davon mindestens 1 kleines Gelenk)	5
<i>Serologie (mindestens 1 Testergebnis erforderlich)</i>	
Negative RF und negative CCP-AK	0
Niedrig-positive RF oder niedrig-positive CCP-AK	2
Hoch-positive RF oder hoch-positive CCP-AK	3
<i>Akute-Phase-Reaktion (mindestens 1 Testergebnis erforderlich)</i>	
Unauffälliges CRP und unauffällige BSG	0
Erhöhtes CRP oder beschleunigte BSG	1
<i>Dauer der Beschwerden</i>	
< 6 Wochen	0
≥ 6 Wochen	1

Vor den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden bei der RA nur entzündungshemmende Schmerzmittel auf Acetylsalicylbasis und Kortikosteroide verordnet, um die Schmerzsymptomatik zu lindern. Erst danach ging man dazu über, mit Methotrexat und anderen krankheitsmodifizierenden anti-Rheumatika (*disease modifying anti-rheumatic drugs*, DMARDs) zu therapieren (49) (siehe Tabelle 2).

Um 1990 wurden die ersten Biologika wie Tumor Nekrose Faktor (TNF) $\alpha$ - und Interleukin 1 (IL-1) -Hemmer eingesetzt, die Zulassung für die RA erfolgte 1999 (49). Diese greifen spezifisch ins Entzündungsgeschehen ein. Biologika sind Proteine oder Proteinhemmer, die gezielt pro-entzündliche Faktoren und Zytokinkaskaden hemmen (69). Auch aus der

Onkologie stammende Biologika, wie Anti-CD20 Antikörper werden heutzutage zur Therapie der RA eingesetzt (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 2: Übersicht über DMARD's, die zur Therapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt werden.**

<b>Wirkstoffklasse</b>	<b>Wirkstoff</b>	<b>Handelsnamen (Beispiele)</b>	<b>Referenz</b>
Glukokortikoide	Cortisol	Hydrocortone	63
	Dexamethason	Fortecortin	18
	Prednison	Decortin	5
	Prednisolon	Decortin H	66
Immunsuppressiva	Azathioprin	Azafalk, Imurek, Colinsan	84
	Ciclosporin A	Cicloral, Immunosporin	73
	Leflunomid	Arava	73
nichtsteroidales Antirheumatika	Diclofenac	Voltaren	89
	Ketoprofen	Spondylon	89
Coxibe	Celecoxib	Celebrex	19
Zytostatika	Methotrexat	Bendatrexat, Lantarel, Metex,	73
	Cyclophosphamid	Endoxan	29
Immunmodulatoren	Chloroquin	Resochin, Quensyl	79, 73
	D-Penicillamin	Trolovol	66
	Goldverbindungen	Auranofin, Tauredon	73
	Sulfasalazin	Azulfidine, Colo-Pleon, Pleon RA	73

**Tabelle 3: Übersicht über Biologika, die zur Therapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt werden.**

<b>Wirkstoff</b>	<b>Handelsname</b>	<b>Wirkung</b>	<b>Art</b>	<b>Referenz</b>
Abatacept	Orencia	hemmt T-Zellen über Kostimulation	Fusionsprotein aus Ig und CTLA-4	5
Anakinra	Kineret	IL-1-Rezeptor-Antagonist	kurze methionisierte Form des humanen IL-1R-Antagonisten	21
Adalimumab	Humira	Anti-TNF-Antikörper	humaner monoklonaler Antikörper	5, 73
Certolizumab	Cimzia	Anti-TNF-Antikörper	Fab-Fragment eines rekombinanten, humanisierten monoklonalen Antikörpers an Polyethylenglykol gekoppelt	5
Etanercept	Enbrel	löslicher TNF-Rezeptor	Fusionsprotein aus IgG1 und TNF Rezeptor 2	5, 73
Golimumab	Simponi	Anti-TNF-Antikörper	humaner monoklonaler Antikörper	5
Infliximab	Remicade	Anti-TNF-Antikörper	chimärer monoklonaler Antikörper	5, 73
Rituximab	MabThera	Anti-CD20 Antikörper	chimärer monoklonaler Antikörper	5
Tocilizumab	RoActemra	Anti-IL-6 Antikörper	humanisierter monoklonaler Antikörper	5

Zur Therapie der RA werden sowohl Mono- als auch Kombinationstherapien eingesetzt, wobei in der Regel Biologika mit DMARDs kombiniert werden (73).

## 1.2. Osteoarthritis

Die Osteoarthritis (OA) ist eine Gelenkerkrankung, bei der Knorpel und Knochen der betroffenen Gelenke durch mechanische Belastung und oder einer genetischen Präposition verändert sind. Die schmerzhaften Veränderungen laufen im Gegensatz zur RA ohne chronische Entzündung oder autoimmunreaktive Prozesse ab. Symptome der Osteoarthritis sind Gelenkschmerzen während der Bewegung, Steifheitsgefühl am Morgen oder während der Ruhephasen, reduzierte Bewegungsfreiheit und Knochenschwellungen. Zunächst erfolgt eine nichtmedikamentöse Behandlung bevor leichte Schmerzmittel verordnet werden. Die Dosis der Schmerzmittel wird verstärkt und den Bedürfnissen des Patienten angepasst. Wenn der Patient auf keine medikamentöse Behandlung mehr anspricht oder die Gelenkerosion zum Verlust der Funktion des betroffenen Gelenks führt, werden Teile oder das gesamte Gelenk chirurgisch entfernt, um die Lebensbedingungen für den Patienten zu verbessern. Es werden z.B. IL-1, Matrixmetalloproteasen und Angiogenese-fördernde Faktoren von den krankheitsbedingt veränderten Chondrozyten abgegeben und sind in erhöhten Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit zu finden. Die synovialen Fibroblasten haben keinen Einfluss auf die Knorpel und Knochen Zerstörung (40 und 62).

## 1.3. Aufbau des Gelenks

Das gesunde Gelenk (Abb. 2 A) besteht aus mindestens zwei Knochen die aneinandergrenzen. Die Grenzflächen sind mit Knorpel bedeckt. Zwischen den Knorpelflächen befindet sich ein Gelenkspalt, der mit Synovialflüssigkeit gefüllt und von einer Gelenkkapsel umgeben ist (59). Beim Gelenkknorpel handelt es sich zumeist um hyalinen Knorpel, der vor allem aus Kollagen Typ II, VI und IX und Glykoproteinen, wie Proteoglykanen, Hyaluronsäure und Fibronectin, besteht (35). Die Knorpelmatrix wird von Chondrozyten synthetisiert, die sich in Knorpelzellohlen (Lakunen, Chondrone) im Knorpelgewebe befinden (59). Die Innenhaut der Gelenkkapsel wird durch das Synovium, das unterhalb der Knochen-Knorpel-Grenze am Knochen anliegt, ausgekleidet (24). Das Synovium besteht aus zwei Schichten, dem *lining layer*, einer circa 2 bis 3 Zellschichten betragenden Grenzschicht zur Synovialflüssigkeit hin und dem *sublining*, einer mehrzelligen Schicht, die an das Kapselgewebe grenzt. Das *lining layer* eines gesunden Menschen besteht vorwiegend aus zwei Zelltypen, dem Synoviozyten Typ A und dem Synoviozyten Typ B. Der Synoviozyt Typ A, weist einen makrophagenartigen Phänotyp (CD11b<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD163<sup>+</sup>, *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Klasse

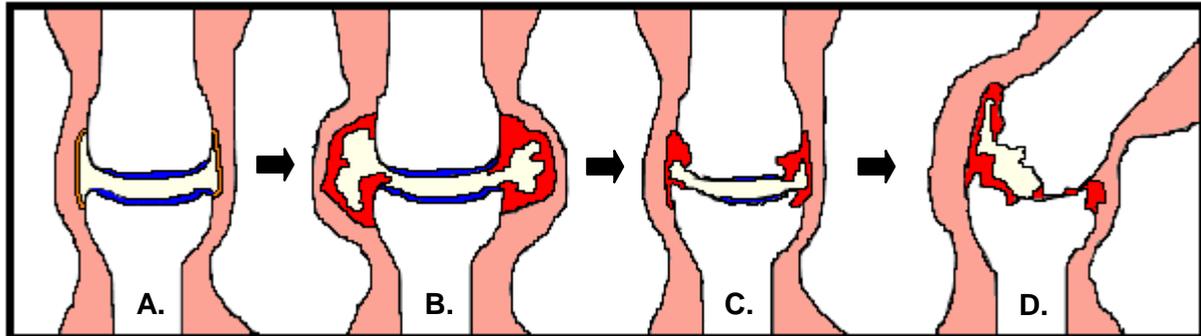
II Antigen<sup>+</sup> und *Constant Fragment Receptor*  $\gamma$  (FcR $\gamma$ )<sup>+</sup> auf. Der Synoviozyten Typ B ist fibroblastenartig und exprimiert Kollagen Typ IV und V sowie Vimentin und CD90. Der Synoviozyt Typ B wird auch synovialer Fibroblast (SF) oder fibroblastenartiger Synoviozyt (FLS) genannt (9). Die hauptsächlich aus Hyaluronsäure und Proteinen bestehende Synovialflüssigkeit wird von den SF synthetisiert (59 und 35).

Der Aufbau eines gesunden Gelenks mit zellulären und azellulären Strukturen verleiht ihm sowohl Stabilität als auch Beweglichkeit. Die Stabilität wird vor allem durch die Gelenkkapsel und die sie umgebenden Muskeln und Sehnen, die den Stützapparat bilden, aufrecht erhalten. Für die hohe Flexibilität des Gelenks sorgt einerseits die Knorpelschicht, die den Knochen im Bereich des Gelenkspalts überzieht und die auftretende Reibung minimiert. Andererseits ist auch die Synovialflüssigkeit des Gelenkspalts wichtig, welche auftretende Stoßkräfte dämpft und die Reibung reduziert. Zusätzlich versorgt die Synovialflüssigkeit die angrenzenden Gewebe mit Nährstoffen und sorgt für den Abtransport von Abfallstoffen (9 und 35).

#### **1.4. RA-vermittelte Gelenkveränderungen**

Zu Beginn der rheumatoiden Arthritis kommt es meistens zu einer entzündlichen Reaktion (siehe Abb. 2 B). Diese als Synovitis bezeichnete Entzündung des Synovialgewebes zeichnet sich durch einen erhöhten Einstrom von Immunzellen sowie eine lokale synoviale Hyperplasie aus. Das daraus entstehende sogenannte Pannusgewebe ist stark durchblutet, was auf eine erhöhte Konzentration an Angiogenese-fördernden Faktoren und auf eine durch die Gewebhyperplasie vermittelte lokale Hypoxie zurückzuführen ist (9). Alle lokalen Zelltypen im rheumatisch veränderten Gelenk sind an der Aufrechterhaltung und Fortdauer der Erkrankung beteiligt. Im Synovialgewebe wurden erhöhte Konzentrationen an Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren, zitrullinierten Proteinen, Bestandteilen der ECM und extrazellulärer DNS sowie an autoreaktiven Antikörpern gefunden (76, 20, 1 und 33). Außerdem scheint die im Pannusgewebe vorhandene Hypoxie einen Einfluss auf das Verhalten einzelner Zellen zu haben (76). Diese genannten Faktoren sind in der Lage das Entzündungsgeschehen zu beeinflussen und tragen zur Chronifizierung der Entzündung bei. In der chronischen Phase nimmt die Entzündungsaktivität zunächst ab (siehe Abb. 2 C und 2 D). Die entzündlichen Prozesse und insbesondere die Induktion von Umbauprozessen in der extrazellulären Matrix während dieser Phase führen zum vermehrten Abbau der Knorpel- und Knochenmatrix, insbesondere an der Übergangsstelle zwischen Knochen und Knorpel (76). Dabei kann es zur Verschiebung der normalen Gelenkachse kommen, der muskuläre

Halteapparat versagt und das Gelenk ist nicht mehr funktionsfähig. Teilweise sind allerdings radiale Erosionen bereits vor der Entzündung zu beobachten (35).



**Abb. 2: Skizzierter Verlauf der RA.** A. Gesundes Gelenk mit einer das Gelenk umgebenden Muskel- und Sehnschicht ■, dem Synovium ■, der Synovialflüssigkeit im Gelenkspalt ■, einer Knorpelschicht ■ und dem Knochen ■; B. entzündetes Gelenk mit synovialer Hyperplasie und aktiviertem Synovium (Pannus) ■; C. chronische Phase mit beginnender Knorpel- und Knochenerosion, D. stark erodiertes Gelenk mit Fehlstellung

#### 1.4.1. Die Pannusbildung aus dem Synovium

Während der ersten entzündlichen Phase der RA kommt es zur verstärkten Hyperplasie der lokalen Zellen des Synovialgewebes, zur Induktion von Angiogenese sowie zum Einwandern von Entzündungszellen wie T- und B-Lymphozyten ins Synovium, insbesondere ins *Sublining*. Vor allem T-Lymphozyten machen 30 bis 50% der gesamten Zellen aus, wobei es sich hauptsächlich um CD4<sup>+</sup> Zellen handelt, aber in geringer Anzahl auch um CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Bei einem Teil der Patienten sind folliculäre dendritische Zellen innerhalb lymphoider Zellverbände zu sehen. Die beobachtete klonale Expansion von B-Zellen deutet auf eine über Antigen ausgelöste Reifung der B-Lymphozyten im *sublining* hin (9). Auch die innere Schicht in Richtung des Synovialspalts, das *lining layer*, vergrößert sich von 2 bis 3 auf 10 bis 20 Zellschichten. Dies wird durch eine längere Lebensdauer der lokalen Synoviozyten, eine Apoptoseresistenz lokaler Zellen sowie durch einen vermehrten Zustrom des makrophagenartigen Zelltyps über das Blutkreislaufsystem vermittelt (9). Die synovialen Makrophagen zeichnen sich durch eine erhöhte Produktion an pro-inflammatorischen Faktoren aus, wie z.B. Zytokinen (Interleukin 6 (IL-6), Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )) (9), Chemokinen (Interleukin 8 (IL-8), CXCL-5, CCL-2) (15) und Wachstumsfaktoren (z.B. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ )) (76) und erzeugen so ein hoch entzündliches Milieu im Gelenk (9). In dieser pro-entzündlichen und hypoxischen Umgebung produzieren die SF erhöhte Mengen an proinflammatorischen Faktoren aber auch Prostaglandinen und Matrixmetalloproteasen

(MMPs) (9), welche den Knorpel und später auch den Knochen insbesondere an der Knorpel-/Knochen-Grenze abbauen. Alle Zelltypen beeinflussen sich gegenseitig und das Entzündungsmilieu wirkt wiederum aktivierend und proentzündlich, wodurch die Entzündung auch langfristig nicht abklingt (9). Die vermehrte Raumforderung des entzündeten Pannusgewebes (siehe Abb. 3), die vermehrte Prostaglandin- und TNF-Produktion (55), die Reduktion der Knorpel- und Knochenmatrix und die daraus resultierende Reibung der erodierten Gelenkoberflächen wirken sich schmerzhaft und bewegungseinschränkend auf die Patienten mit RA aus.

Aufgrund einer verstärkten Angiogeneseinduktion wird das Synovialgewebe stark durchblutet. Die löslichen bzw. membrangebundenen Angiogenesemediatoren werden hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen produziert, welche auf die Endothelzellen der Gefäße im Synovium einwirken. Die Endothelzellen nehmen selbst ebenfalls eine aktive Funktion während dieser Entzündung ein. In der Synovitis sind sowohl die Vasodilatation (Gefäßerweiterung) durch z.B. Stickstoffoxid, Prostacyclin, *platelet-activating factor* und Histamin, die Gefäßpermeabilität durch z.B. Histamin, Sereotonin und Bradikin und die Gefäßeinsprossung durch z.B. *Reactive Oxygen Species* (ROS), MMP, *Antiendothelial Cell Antibodies* (AECA), TNF $\alpha$ , IL-1 sowie Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), erhöht (103). Selektine, viele Integrine sowie weitere Adhäsionsmoleküle und eine große Anzahl verschiedener Chemokine sowie deren Liganden wurden ebenfalls im RA-Synovium nachgewiesen und sind für die oben genannten Prozesse von zentraler Bedeutung.



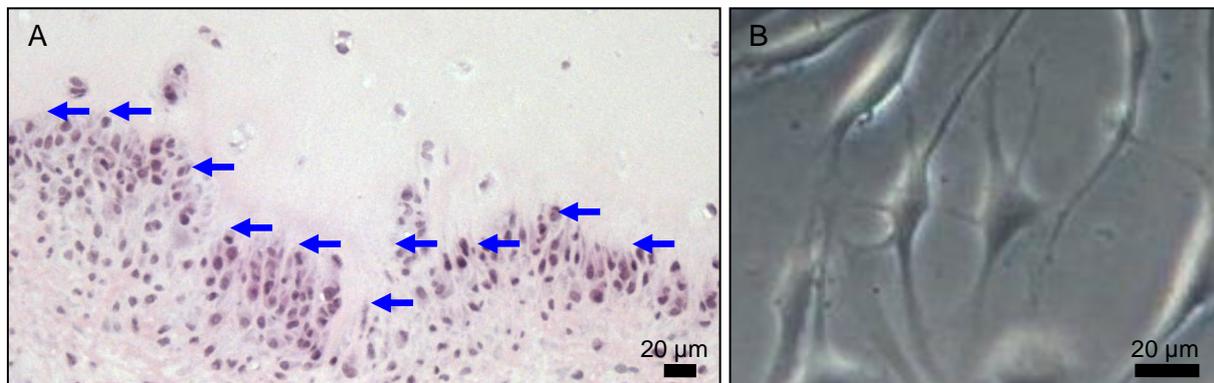
**Abb. 3: Hyperplastisches Synovialgewebe eines Patienten mit rheumatoider Arthritis.** Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. R. Dinser, Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim.

## 1.5. Fibroblasten

Fibroblasten sind, gewebständige aber bewegliche Bindegewebszellen mesenchymaler Herkunft. Die verschiedenen Fibroblasten sind in der Lage, dem jeweiligen Bedarf angepasste Konzentrationen an Matrixbestandteilen, Zytokinen und Chemokinen zu synthetisieren. Fibroblasten können in andere Bindegewebszelltypen ausdifferenzieren, wie z.B. Adipozyten oder SMC (*smooth muscle cells*). Desweiteren sind sie in der Lage Angiogenese induzierende Faktoren (z.B. VEGF) sowie extrazelluläre Matrix (z.B. Kollagene, Proteoglykane) zu sezernieren aber auch abzubauen (über MMP und Cathepsine). Da beide Prozesse für die Geweberegeneration wichtig sind, werden Fibroblasten auch als zentrale Wundheilungszellen angesehen (12).

RASF weisen einen aktivierten Phänotyp auf, der auch nach der Entnahme und Kultivierung *in vitro* über viele Passagen eine erhöhte Produktion von pro-entzündlichen Zytokinen zeigt (46, 76 und 80). RASF produzieren zusätzlich vermehrt Matrix-degradierende Moleküle, unter anderem MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, MMP10 und MMP13 sowie die Cathepsine L und K. Diese Faktoren sind für den Abbau extrazellulärer Matrix, z.B. des Knorpels verantwortlich (80). RASF sind insbesondere bei Gelenken, die durch die RA verändert sind, aktiv und dort für die Invasion des Gelenkknorpels verantwortlich (Abb. 4). Außerdem tragen SF *Toll-Like Receptors* (TLRs) wie TLR2, TLR3 und TLR4 auf ihrer Oberfläche (76) und können somit auf extrazelluläre Lipoproteine und Glycolipide (TLR2), doppelsträngige Ribonucleinsäuren (dsRNS), Lipopolysaccharide (LPS) und Hitzeschockproteine sowie *Polyinosinic-polycytidylic acid* (Poly-(I:C)), und TNF reagieren. Die Interaktion von aktivierten RASF mit anderen, im Gelenk befindlichen Zelltypen wie Chondrozyten, Osteoklasten und deren Vorläuferzellen, Makrophagen, T- und B-Zellen und Endothelzellen wirkt auf die RASF aktivierend und entzündungsfördernd (76). Chondrozyten, die für die Erhaltung der Knorpelmatrix verantwortlich sind, werden durch IL-1, welches von RASF sezerniert wird, zur Produktion von MMP und Cathepsinen angeregt, was zur perichondrozytären Knorpeldegradation führt (76). RASF fördern zusätzlich die Osteoklastogenese und aktivieren die im Gelenk vorkommenden Osteoklasten, welche im Knochenumbau als Gegenspieler der Osteoblasten für den Abbau der Knochenmatrix verantwortlich sind. Dies wird durch *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF), TNF, *Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand* (RANKL) und andere Faktoren, die durch RASF gebildet bzw. induziert werden, vermittelt (9, 46 und 76). Durch den Kontakt von RASF mit Makrophagen sowie T- und B-Zellen, werden proinflammatorischen Zytokine wie IL-6 und Chemokine durch RASF sezerniert. Die Immunzellen werden dadurch ihrerseits zu einer vermehrten Sekretion pro-entzündlicher Faktoren stimuliert (76). Weiterhin produzieren RASF unter hypoxischen

Bedingungen vermehrt Faktoren wie VEGF und *Hypoxia-Inducible Factors* (HIF)-1 (20) sowie IL-6 (76), welche zur verstärkten Angiogeneseinduktion im Gewebe führen (20).



**Abb. 4: RASF im RA-Gewebe und in der Kultur.** A: RASF-Invasionsfront in den Knorpel (←) bei einem Hämalun/Eosin gefärbten Explantat; B: Amorphe Form der synovialen Fibroblasten in Kultur. Lichtmikroskopische Phasenkontrast Darstellung.

### 1.5.1. Das Migrationspotential der RASF

Da Fibroblasten als bewegliche, gewebsständige Zellen definiert werden, ist es nicht verwunderlich, dass RASF *in situ* in der Lage sind, innerhalb des Synoviums in Richtung auf ein Chemoattraktans zu migrieren. Im rheumatisch veränderten Gelenk stellt der hyaline Knorpel ein starkes Chemoattraktans dar (57). Auch *in vitro* konnte mittels *Trans Epithelial Electric Resistance* (TEER)-Assay eine Chemotaxis der RASF durch eine Zellschicht auf ein Chemoattraktans zu nachgewiesen werden (9 und 57). Außerdem konnte bei RASF im SCID-Maus Modell der RA eine Migration über Gewebsgrenzen hinaus beobachtet werden. Diese Migration ist RASF spezifisch und konnte bei synovialen Fibroblasten von Patienten mit Osteoarthritis (OASF) nicht beobachtet werden. Es wurde gezeigt, dass diese Migration höchstwahrscheinlich über das Blutgefäßsystem abläuft und das RASF in der Lage sind den Blutkreislauf wieder zu verlassen, um einen kontralateral implantierten Knorpel zu invadieren (57).

## 1.6. Gefäßsystem

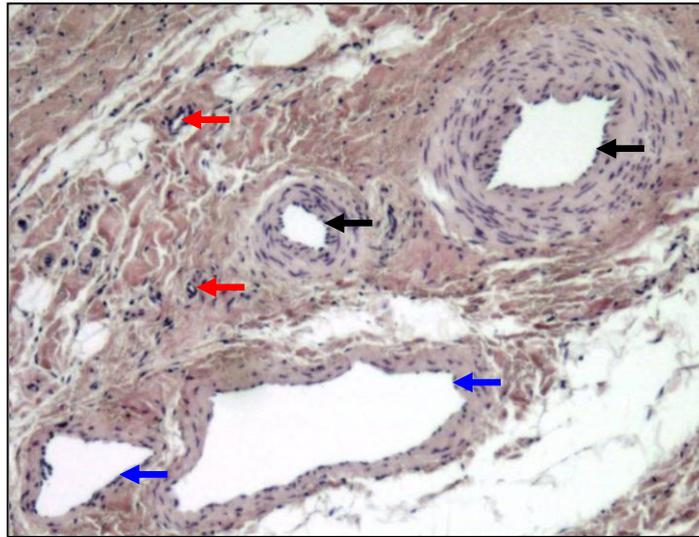
Blutgefäße sind Teil des kardiovaskulären Systems, das ein geschlossenes Kreislaufsystem darstellt, bestehend aus Herz, Lungenkreislauf und Körperkreislauf. Die Blutgefäße sind in Aorta, Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen, Venen und Hohlvenen unterteilt. Die

arteriellen Gefäße sind für den Transport des Blutes vom Herzen zu den Körperzellen verantwortlich. Sie verfügen über eine verstärkte und flexible Gefäßwand, die den unterschiedlichen Druck, der durch den Herzschlag entsteht, abfängt. Arterielle Gefäße befördern, außer im Lungenkreislauf, das sauerstoffreiche Blut. Venöse Blutgefäße transportieren das sauerstoffarme Blut (außer beim Lungenkreislauf) zum Herz zurück und sind, um einen Rückfluss zu verhindern, ab einem bestimmten Durchmesser mit Venenklappen versehen. Kapillaren sind nur einschichtig und realisieren den Gas und Nährstoffaustausch im Gewebe. Interessanterweise läuft die Leukozyten-Transmigration in den postkapillaren Venolen ab, da hier der geringste Scherdruck herrscht.

Im Gefäßsystem fließt das Blut, welches im Wesentlichen aus Plasma, Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten (59) besteht. Das Blut ist für die Versorgung der Körperzellen mit Sauerstoff, Nährstoffen, Botenstoffen und außerdem für die Entsorgung von CO<sub>2</sub> und Abfallstoffen, wie z.B. Harnsäure, verantwortlich. Zusätzlich werden Immunzellen mit Hilfe des Blutstroms zum Ort einer Entzündung transportiert (59).

### **1.6.1. Aufbau der Gefäßwand**

Kapillaren bestehen aus einer einlagigen Endothelzellschicht, einer Basallamina und außen angelagerten Perizyten sowie einer Bindegewebsschicht. Die Wand der übrigen Blutgefäße besteht aus drei Schichten. Die äußerste Schicht wird als *Tunica adventitia* bezeichnet, eine Bindegewebsschicht, die das Blutgefäß mit dem umliegenden Gewebe verbindet. Direkt anliegend befindet sich die *Tunica media*, eine Schicht aus glatten Muskelzellen, elastischen Fasernetzen bestehend aus Typ I und III Kollagenfasern, die bei Arterien mehr Lagen aufweist, als bei Venen (Abb. 5). Zum Gefäßlumen hin befindet sich die *Tunica interna*, welche aus einer Basalmembran und der einlagigen Endothelzellschicht besteht (59).



**Abb. 5: Verschiedenen Gefäßtypen im humanen Synovialgewebe.** Arteriolen (←), Venolen (←) und Kapillaren (←) im Synovialgewebe eines RA-Patienten. Deutlich zu erkennen sind die Größen- und Schichtdicken-Unterschiede der verschiedenen Gefäße.

### 1.6.2. Endothelzellen

Das Endothel besteht aus circa 1 bis  $6 \times 10^{13}$  Endothelzellen (EZ) und bildet somit ein Organ von circa 1 kg Gewicht. EZ kleiden das Lumen der Blut- sowie der Lymphgefäße und des Herzen aus. Sie bilden eine Grenzschicht zwischen dem Gewebe und dem Blut mit einer selektiv-permeablen Barrierefunktion, durch die der Ein- und Austritt von Molekülen und Zellen reguliert wird (100). EZ beinhalten Weibel-Palade-Körperchen, die hauptsächlich zur Lagerung des von Willebrand Faktors (vWF) dienen. Typische Marker für Endothelzellen sind vWF und CD31 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*(PECAM-1)) (108). EZ sind flache Zellen, die eine stark polarisierte Ausrichtung zeigen. Die luminale Plasmamembran steht in direktem Kontakt mit dem Blut und ist an der Hämostase beteiligt. Die abluminale Plasmamembran trägt zur Verankerung der Endothelzellen an der Basalmembran bei und ist beteiligt an der Durchblutungsregulation durch die Freisetzung vasoaktiver Mediatoren. Endotheliale Funktionen werden durch biochemische Mediatoren wie Hormone, Zytokine und Neurotransmitter reguliert (34). Auch ein veränderter Blutdruck oder eine veränderte Fließgeschwindigkeit und somit veränderte Scherkräfte an den Endothelzellen können das Expressionsschema, die Permeabilität, die Zellform und die Migrationsfähigkeit der Endothelzellen verändern. Als mögliche Scherkraft-Sensoren werden unter anderem auch Adhäsionsmoleküle und VEGF-Rezeptor 2 diskutiert (4). Endothelzellen sind aktiv an den Prozessen der Gefäßneubildung und der Extravaskularisation von Entzündungszellen beteiligt.

### **1.6.2.1. Gefäßneubildung**

Es gibt drei Arten der Neovaskularisierung: die Angiogenese, die Vaskulogenese, und die Arteriogenese.

#### *Angiogenese*

Die Angiogenese ist ein Mechanismus, bei dem durch einen Stimulus ein bestehendes Gefäß zur Sprossung gebracht wird. Dabei entsteht eine Kapillarknospe aus einer einzelnen Endothelzelle (Gipfelzelle), die durch eine komplexe Regulation zu einer neuen Kapillare auswächst (56). Die Zellknospung ist das Resultat der Ausschüttung von VEGF durch Gewebszellen (48). VEGF induziert über VEGFR2 ein intrazelluläres Signal, welches die Verlängerung der Filapodien der Gipfelzelle zur Folge hat. Gleichzeitig wird die Differenzierung anderer Zellen zu Gipfelzellen gehemmt (48) und die Expressionsmenge von VEGFR2 mit Hilfe des Transkriptionsfaktor HIF1 auf der Oberfläche der Gipfelzelle erhöht (27). Eine Angiogenese erfolgt in Richtung eines Gradienten z.B. eines VEGF-Gradienten oder aufgrund von Sauerstoff oder Nährstoffmangel im Gewebe, wodurch VEGF induziert wird (27). Angiogenese ist bei der Wundheilung (56), dem Tumorwachstum (20), aber auch bei Entzündungsprozessen wie bei der RA (75) zu beobachten.

#### *Vaskulogenese*

Die Vaskulogenese spielt vor allem in der Embryonalentwicklung eine Rolle. Die Gefäße werden hierbei nicht wie bei der Angiogenese aus fertig ausdifferenzierten Endothelzellen, sondern aus im Blut zirkulierenden CD34-, VEGF Rezeptor 2 (VEGFR2)- und CXCR4-positiven Endothelzellvorläufern (EPC) gebildet. Das stärkste Chemoattraktans für EPC ist *Stromal cell-derived factor-1* (SDF-1)/CXCL 12, ein Chemokin, das an seinen Rezeptor CXCR4 auf der EPC-Oberfläche bindet (102). HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Hypoxie induziert wird und eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von EPC aus dem Blut und bei der Stabilisierung der entstandenen Gefäße spielt (27).

#### *Arteriogenese*

Bei der Arteriogenese entstehen vollständig von einer Muskelschicht umgebene arterielle Gefäße durch den Umbau von Kollateralgefäßen (56). Die Arteriogenese kann aufgrund eines arteriellen Gefäßverschlusses oder durch Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Zell-Zellkontakte initialisiert werden (92 und 91). Der bei der Angiogenese entscheidende

---

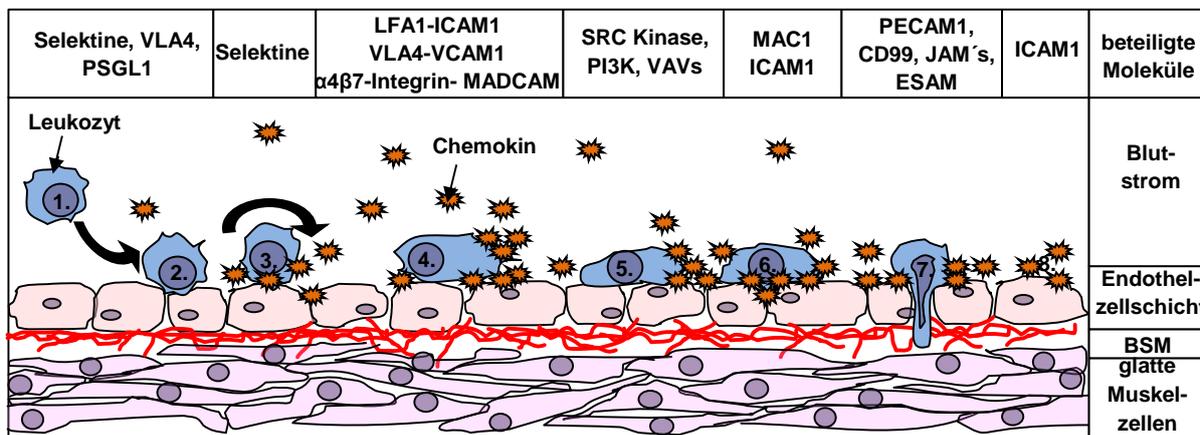
Transkriptionsfaktor (HIF) spielt bei der Arteriogenese keine Rolle, aber ein entzündliches Milieu und die Invasion von Monozyten sind grundlegend (91 und 92).

Der Ablauf der Arteriogenese erfolgt durch vermehrten Scherstress, wodurch es zu einer Aktivierung und Expression aller Stickstoff-Synthasen (NOS)-Isoformen und der Produktion von Stickstoffmonoxid kommt. Im Anschluss daran wird VEGF von den Endothelzellen sezerniert, was in den Endothelzellen und glatten Muskelzellen zu einer Induktion der *Monocyte Chemotactic Protein-1* (MCP-1) Synthese führt. MCP-1 aktiviert daraufhin Monozyten, wodurch diese zu den Endothelzellen der Kollateralen migrieren. Die mononukleären Zellen sezernieren Proteasen und Wachstumsfaktoren, was zu einem Verdau des extrazellulären Halteapparates der kleinlumigen Kollateralen führt und damit mehr Beweglichkeit und Raum für neue Zellen schafft. Die glatten Muskelzellen dedifferenzieren anschließend von einem kontraktilen zu einem synthetisierenden und proliferativen Phänotyp (91), wodurch der Umbau der Kollateralen abgeschlossen wird. Kollaterale sind arterielle oder venöse Parallelwege zur Hauptstrombahn. Sie können bei Verschluss der Hauptstrombahn das von ihr abhängige Kapillargebiet versorgen (59). Der gewundene Aufbau ist ein typisches Merkmal für Kollaterale (91). Schon vor 100 Jahren wurde gemutmaßt, dass ein Netzwerk aus untereinander verbundenen Arteriolen zwischen den menschlichen Koronararterien bereits vor der Geburt angelegt wird. Kollaterale Gefäße werden im peripheren Kreislauf von Mäusen nicht *de novo* gebildet (91).

#### **1.6.2.2. Die Adhäsionskaskade von Leukozyten an Endothelzellen**

Das sogenannte Leukozyten-*homing* ist ein Beispiel für ein genau reguliertes Transmigrationsereignis durch eine Endothelschicht (67). Während des aus mehreren Phasen bestehenden Prozesses, sind die Leukozyten in der Lage, das Blutgefäßsystem an genau definierten Stellen zu verlassen. Sowohl die Oberflächenmoleküle und die sezernierten Chemokine der EZ sowie die Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der Leukozyten sind von entscheidender Bedeutung. Während der ersten Phase der Extravaskularisation (Austritt aus dem Gefäßsystem) kommen die Leukozyten durch zufällige Verwirbelungen im Blutstrom in die Nähe der EZ-Schicht und werden dort in ihrer Bewegung abgebremst. Dieser erste Kontakt wird durch die Adhäsionsmoleküle E- und P-Selektin vermittelt, die vor allem von EZ exprimiert werden, die durch eine Entzündung im umliegenden Gewebe aktiviert wurden (siehe Abb. 6) (67). Der Leukozyt bindet an das E- und P-Selektin über Oberflächenoligosaccharide wie CD44, CD15s und *Carcinoembryonic Antigen* (CEA) auf seiner Oberfläche (16). Auch Leukozyten können mittels eines Selektins (L-Selektin) zuckerhaltige Proteine oder P-Selektin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL1) auf der

Oberfläche der Endothelzellen binden, wodurch eine erste Bindung mit anschließendem langsamen Rollen über das Endothel herbeigeführt wird. Die Adhäsion der Zellen über Selektine bedarf einer ständigen Strömung über das Endothel. Bricht die Flussbewegung ab, löst sich die Bindung zwischen den Zellen. Während des langsamen Rollens werden Konformationsänderungen weiterer Adhäsionsmoleküle, der Integrine, induziert, wodurch es zu einer Erhöhung der Bindungsfestigkeit zwischen Leukozyten und Endothelzellen kommt. (60), Durch die Bindung werden Kinasen induziert wie z.B: Sarcoma (SRC) Kinase, Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und Guanosintriphosphat-Austausch-faktoren (VAVs). Außerdem werden von beiden an der Adhäsion beteiligten Zelltypen Chemokine sezerniert (Abb. 6), die aktivierend wirken (67). Im Anschluss daran erfolgt das sogenannte „intravaskuläre Kriechen“, das größtenteils durch Integrine induziert wird. Die Transmigration der Leukozyten kann para- oder transzellulär erfolgen (60). Die parazelluläre Route erfordert die Expression einer Vielzahl von Adhäsionsmolekülen, wie *Vascular Endothelial Catherin* (VE-Cadherin), PECAM1, *Junctional Adhesion Molecule* (JAM)-A, EZ spezifisches Adhäsionsmolekül (ESAM), *Intercellular Adhesion Molecules* (ICAM) 2 und CD99. An der transzellulären Transmigration sind zelluläre Strukturproteine sowie ICAM1 und ERM-Proteine (Ezrin, Radizin und Moesin) beteiligt. Danach wird die Perizytenhülle passiert, die nicht komplett dicht ist. Die Basalmembran wird durch Proteasen lysiert und durchwandert (60). Der Vorgang der Extravaskularisation ist in Abb. 6 dargestellt.



**Abb. 6 Skizzierter Ablauf der Leukozyten-Adhäsionskaskade.** Die beteiligten Moleküle sind über der Darstellung entsprechend der verschiedenen Abläufe dargestellt (60). 1. Annäherung; 2. Abbremsen aus dem Blutstrom; 3. langsamer werdendes Rollen; 4. Adhäsion; 5. Verstärkung der Bindung; 6. intravaskuläres Kriechen; 7. parazelluläre Transmigration; 8. transzelluläre Transmigration und Wanderung durch die Basalmembran und die Perizytenhülle. Die Aktivierung durch Chemokine geschieht während Phasen 2 bis 4. MAC1, Makrophagen 1 antigen; LFA-1, *Lymphocyte function-associated antigen 1*; VLA4, *Very Late antigen 4*; BMS, Basalmembran

### 1.6.3. Thrombozyten

Thrombozyten sind die kleinsten, zellulären Bestandteile des Blutes. Sie entstehen im Knochenmark durch Abschnürung von Megakaryozyten und enthalten weder einen Kern noch DNS. Ihre Funktion besteht darin, nach einer Verletzung der Endothelzellschicht die Hämostase einzuleiten. Dabei gehen sie mit der freiliegenden Matrix der Basalmembran sowie untereinander Bindungen ein, wodurch ein Verschluss der Gefäßwand entsteht und die Blutung stoppt (Hämostase). Außerdem sezernieren sie gerinnungsfördernde Faktoren, die ebenfalls zur Hämostase beitragen. Weiterhin wird Thrombozyten auch eine Rolle beim Auswandern der Leukozyten aus dem Blut und der ROS induzierten Permeabilitätssteigerung der EZ-Schicht zugeschrieben. Sie sind mit Hilfe des Adhäsionsmoleküls CD42b in der Lage, sowohl an MAC 1 von Leukozyten, den vWF von aktivierten Endothelzellen und P-Selektin zu binden (34). Bei verschiedenen Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass Leukozyten allein nicht an die EZ-Schicht binden. Im Gegensatz dazu binden mehrzellige Leukozytenaggregationen, die durch Thrombozyten verbunden werden, der beschriebene Prozess scheint P-Selektin abhängig zu sein (36).

## 1.7. Extrazelluläre DNS und RNS

Bisher wurde davon ausgegangen, dass extrazelluläre RNS (exRNS) sofort von extrazellulär vorliegender RNase abgebaut wird und deshalb keinen Einfluss auf die Zellen nimmt. Auch extrazelluläre DNS (exDNS) wurde bisher nur sehr wenig beforscht. Neuere Ergebnisse zeigen aber, dass beide Moleküle verschiedene Funktionen erfüllen (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Übersicht über bekannte Wirkungen extrazellulärer RNS/DNS**

Nucleinsäure	Effekt	Ort	Quelle
exRNS	VEGF abhängige Hyperpermeabilität	Blut/Hirnschranke	26
exRNS	prokoagulativer Faktor	Wundverschluss und Thrombusbildung	45
exDNS	Pathogenabwehr durch DNS-Netz-Bildung	Neutrophile, bei Kontakt mit verschiedenen Bakterien	11
exDNS (mitochondrial)	proinflammatorischer Effekt	RASF	33
exDNS	verstärkte Produktion von induzierbarer NOS	bei 24 h Kultur <i>in vitro</i> von <i>Endothelial Cells from the Umbilical Veins</i> (HUVECs) mit exDNS	51

Als möglicher Bindungspartner für extrazelluläre RNS wird Faktor VII-aktivierende Protease (FSAP) angeführt, die mit RNS als Kofaktor eine koagulative Aktivität aufweist (3). Außerdem bindet TLR3 doppelsträngige und TLR7 sowie TLR8 einzelsträngige RNS (97). Extrazelluläre DNS kann an TLR9 binden oder über membranassoziiertes Nukleinsäure-bindendes Protein (MNAB) ins Zellinnere aufgenommen werden (97). Somit kann exRNS bzw. exDNS auf verschiedene Zellen und zelluläre Prozesse Einfluss nehmen.

## **1.8. SCID-Maus Modell der RA**

Bei diesem Tiermodell werden Mäuse verwendet, die eine SCID-Mutation aufweisen. SCID steht für *severe combined immunodeficiency*. Es handelt sich um eine Mutation in den Genen, die für die Entwicklung und Differenzierung von T-Lymphozyten verantwortlich sind. Das bedeutet, dass das adaptive Immunsystem (bestehend aus T- und B-Zellen) fehlt, aber das angeborene Immunsystem (bestehend aus Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen) vorhanden ist. SCID-Mäuse müssen unter sterilen Bedingungen gehalten werden, da sie Pathogene nicht ausreichend abwehren können und schon kleine Infektionen tödlich verlaufen können (57).

Aufgrund der Abwesenheit des adaptiven Immunsystems sind die SCID-Mäuse nicht in der Lage, humanes Gewebe abzustößen. Diese Eigenschaft wird im SCID-Maus Modell der RA genutzt, da in diesem Modell humaner, gesunder Knorpel mit RASF koimplantiert werden und in Abwesenheit von Entzündungszellen beobachtet werden können. So wurde herausgefunden, dass die Aggressivität der RASF auch in Abwesenheit der chronischen Entzündung und der beteiligten Zellen des Immunsystems über lange Zeit aufrecht erhalten bleibt (57).

## 1.9. Zielsetzung

Basierend auf dem SCID-Maus Modell der RA konnte durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass humane RASF durch das Blutgefäßsystem von einer primären Implantationsseite zur kontralateralen Seite migrieren können (57). Ein zentrales Chemoattraktans für die Migration der RASF stellen hierbei die Bestandteile der freiliegenden Knorpelmatrix dar (77).

Im Verlauf dieser Doktorarbeit sollten detaillierte Analysen zur Migrationsfähigkeit der RASF und deren Interaktion mit EZ durchgeführt werden. Dafür wurden folgende Aufgabenstellungen bearbeitet:

- 1.) Aufklärung der Transmigrationskinetik der RASF im SCID-Maus Modell. Hierbei sollte der Zeitpunkt, an dem die Fibroblastenmigration einsetzt sowie der Ankunftszeitpunkt der RASF auf der kontralateralen Implantationsseite bestimmt werden.
- 2.) Analyse der Mechanismen, die für den Kontakt und die Interaktion von RASF mit EZ verantwortlich sind.
- 3.) Bestimmung der Transmigrations- und Adhäsionsfähigkeit der RASF durch bzw. an verschiedene EZ-Schichten.
- 4.) Nachweis der Migration der RASF durch das murine Gefäßsystem zu verschiedenen Zeitpunkten. Untersuchung von möglicherweise auftretenden phänotypischen Veränderungen der RASF im Blutstrom.
- 5.) Untersuchungen zu Interaktionen von RASF mit Thrombozyten.
- 6.) Aufklärung der Rolle von RASF-ständigen Adhäsionsmolekülen, die eine Bindung an das Endothel und die Interaktion von RASF mit EZ ermöglichen.
- 7.) Hemmung der Transmigration von RASF mittels extrazellulärer RNS, extrazellulärer DNS oder therapeutisch eingesetzter RA-Medikamente.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zur Klärung der molekularen Grundlagen der transendothelialen RASF-Migration beitragen. Durch die Hemmung der RASF-Transmigration könnte die Ausbreitung der durch RASF vermittelten Gelenkerstörung verhindert werden bzw. auf die primär befallenen Gelenke beschränkt werden, was die Therapie und den Lebensalltag der Patienten deutlich verbessern würde. Zusätzlich könnte durch die Kombination der RASF-Migrationshemmung und einer Reduktion der Immunantwort die RA im primären Gelenk behandelt und vielleicht vollständig zur Ruhe gebracht werden.

## 2. MATERIAL

### 2.1. Untersuchte Organismen

#### 2.1.1. Verwendete Maus-Stämme

In der vorgelegten Dissertation wurden für verschiedene Analysen zwei unterschiedliche SCID-Maus-Stämme verwendet.

Tab. 6: Liste der verwendete Mausstämme

Name	genetischer Hintergrund	Leukozyten	Phänotyp	Hersteller
Fox Chase SCID® Mouse	CB/lcr-Prkdc <sup>scid</sup> /lcrCrl	T <sup>-</sup> /B <sup>-</sup> /NK <sup>+</sup> /Mφ <sup>+</sup> /Granulozyten <sup>+</sup>	SCID-Maus	(Charles River, Sulzbach)
SCID-Select mice E <sup>-/-</sup> / P <sup>-/-</sup>	Balb/c scid E-/P-select <sup>-</sup>	T <sup>-</sup> /B <sup>-</sup> /NK <sup>+</sup> /Mφ <sup>+</sup> /Granulozyten <sup>+</sup>	E-/P-Selektin defiziente SCID-Maus	(freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom UKE Hamburg (50))

#### 2.1.2. Verwendete Zellen

Tab. 7: Liste der verwendeten Zellen

Name	Hersteller
<i>umbilical vein endothelial cells</i> (HUVECs),	Promocell, Heidelberg
<i>human umbilical arterial endothelial cells</i> (HUAECs),	Promocell, Heidelberg
humane variköse EZ (VEC),	selbst isoliert
humane venöse EZ (HVE)	selbst isoliert
humane arterielle EZ (HAE)	selbst isoliert
synoviale Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RASf)	selbst isoliert
synoviale Fibroblasten von Patienten mit Osteoarthritis (OASF)	selbst isoliert
synoviale Fibroblasten von gesunden Probanden (NSF)	selbst isoliert
synoviale Fibroblasten von Patienten mit Psoriasisarthritis (PsA-SF)	selbst isoliert
Thrombozyten	Blutbank des Universitätsklinikums Gießen und Marburg

## 2.2. Verwendete Chemikalien

Tab. 8: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
0,9 % NaCl-Lösung	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
10 x Trypsin / EDTA	PAA Laboratories, Cölbe
4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Roche Diagnostik Mannheim
Aquatex®	Merck, Darmstadt
Calcein-AM	Invitrogen. Karlsruhe
DAKO ® <i>Fluorescent Mounting Medium</i>	DAKO Corporation Carinteria, CA, USA
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> ), 1 g / ml Glukose	PAA Laboratories, Cölbe
<i>Endothelial Cell Growing Medium</i>	Promocell, Heidelberg
<i>Endothelial Cell Growing Supplement (ECGS)</i>	BD Biosciences, Heidelberg
Entellan	Merck Chemicals, Darmstadt
Erythrozytenlyse-Puffer	Qiagen, Hilden
FCS ( <i>Fetal Calf Serum</i> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gelatinematrix (Gelfoam®)	Pfizer, New York
Heparin Natrium braun 25000 I.E./5ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Heparin-Natrium Braun 25000 I.E./5 ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)-	PAA Laboratories, Cölbe
Ketamin-Actavis	Actavis, Langenfeld
Natriumcitrat (Anticoagulant Citrate Dextrose Solution)	Caridian BCT Europe Zaventern, Belgien
Penicillin / Streptomycin (P / S)	PAA Laboratories, Cölbe
<i>Polyinosinic-polycytidylic acid potassium salt (Poly(I:C))</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteaseinhibitor-Tablette (Complete Mini Protease-Inhibitor-Cocktail Tablette)	Roche Diagnostik, Mannheim
Rattenschwanzkollagen (RSK)	BD Biosciense, Heidelberg
RNase-Inhibitor	Epicentre® Biotechnologies, Madison, USA
Rompum 2 %	Bayer, Leverkusen
RPMI 1640	PAA Laboratories, Cölbe
PBS ( <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Ca und Mg</i> )	PAA Laboratories, Cölbe
<i>Supplement Mix</i>	Promocell, Heidelberg

**Tab. 8: Verwendete Chemikalien**

Tissue-Tek® OCT™ Compound (Einbettmedium)	Sakura, Staufen
--	-----------------

Alle nicht genannten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH, Karlsruhe und Sigma-Aldrich, Taufkirchen erworben.

### 2.2.1. Verwendete Medien

**Tab. 9: Liste der verwendeten Medien**

Name	Grundmedium	FCS	P / S	HEPES	Zusatz
Fibroblasten- medium	DMEM	10%	1 U/ml	1 mM	-
Endothelzell- medium	DMEM	20%	1 U/ml	1 mM	1 ml ECGS- Lösung
HUVEC- Medium	<i>Endothelial Cell Growth Medium</i>	2% im <i>Supplement Mix</i>	1 U/ml	-	<i>Supplement Mix</i>
RPMI	RPMI	10%	1 U/ml	1 mM	-
serumfreies Medium	DMEM	-	1 U/ml	1 mM	-
serumreduziertes Medium	DMEM	2%	1 U/ml	1 mM	-

**Tab. 10: Unterschiede in der Zusammensetzung der Grundmedien**

Bestandteil	DMEM	RPMI
Glukose	1 g/l	2 g/l
Eisen(III)nitrat	0,1 mg/l	-
Aminosäuren	15	20
Vitamine	wenige	viele

## 2.2.2. Verwendete Lösungen

Tab. 11: Liste der verwendeten Lösungen, die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur (RT) soweit nicht anders beschrieben

Bezeichnung	Bestandteile
DAPI-Stammlösung	5 mg 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid in 1 ml dH <sub>2</sub> O, aliquotieren und dunkel bei -20 °C gelagert
ECGS-Lösung	100 mg ECGS, 20 ml serumfreies DMEM, bei -20 °C gelagert
Einfriermedium	9 ml FCS und 1 ml DMSO für eine Woche bei 4 °C gelagert
Eosin-Lösung	10 g Eosin in 1 l dH <sub>2</sub> O lösen, filtrieren und bis zum Gebrauch dunkel lagern vor Gebrauch einige Tropfen 96%ige Essigsäure zugeben
Hämalaun	1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Kaliumaluminiumsulfat, in 1 l dH <sub>2</sub> O vollständig lösen, dann 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure dazugeben, filtrieren und bis zum Gebrauch dunkel lagern
Kristallviolett-Lösung	10 g Kristallviolett in 10 ml Methanol
Narkose	480 µl/ml Ketamin, 160 µl/ml Rompun und 360 µl /ml steriles NaCl-Lösung
Protein -Lysepuffer	0,05 M Tris und 1% Nonidet P40 in dH <sub>2</sub> O lösen, auf 10 ml davon eine Proteaseinhibitor-Tablette geben
Rattenschwanzkollagen-Lösung	0,25 ml Rattenschwanzkollagen in 9,75 ml sterilem PBS lösen
RNA-Lysepuffer	RLT-Puffer aus RNeasy Midi Kit; Qiagen, Hilden, 1 ml des Puffers wurden mit 10 µl β-Mercaptoethanol versetzt
RNase-Puffer (pH 8,0)	50 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl, 2 mM EDTA und 0,1 mg/ml azetyliertes BSA in dH <sub>2</sub> O lösen
TAE-Puffer (pH 8,0)	40 mM Tris, 20 mM Eisessig und 1 mM EDTA in dH <sub>2</sub> O lösen

## 2.3. Verwendete Antikörper

Tab. 12: Verwendete primäre Antikörper bei immunologischen Färbungen.

Name	Isotyp	Verd.	Block-substanz	Inkubationszeit	Hersteller
anti-humanes CD 31	murines IgG2Ak	1:100	5% Magermilchpulver	1 Stunde bei RT	R&D Systems, Wiesbaden
anti-humanes Vimentin	murines IgG2Ak	1:100	5% Magermilchpulver	über Nacht bei 4°C	Dako, Hamburg
anti-humanes Follistatin	murines IgG2Ak	1:100	5% Magermilchpulver	1 Stunde bei RT	R&D Systems, Wiesbaden
anti-humanes CD15s	murines IgMk	1:200	5% Magermilchpulver	über Nacht bei 4°C	BD Bioscience, Heidelberg
anti-murines CD42b	IgG2A aus Ratte	1:50	5% Magermilchpulver	über Nacht bei 4°C	Emfret Analytics, Eidelstadt
anti-murines $\alpha$ -SMA + Cy3	murines IgG2Ak	1:300	-	1 Stunde bei RT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-murines CD31	murines IgG1	1:100	5% Magermilchpulver	1 Stunde bei RT	Caltag Medsystems, Buckingham, UK
anti-murines CD31	IgG aus Hase	1:100	5% Magermilchpulver	1 Stunde bei RT	Abcam, Cambridge, UK

Tab. 13: Verwendete sekundäre Antikörper bei immunologischen Färbungen.

Name	Verdünnung	Block-substanz	Inkubationszeit	Hersteller
<i>Histofine Simple Stain MAX PO (Multi) Anti-mouse, -rabbit</i>	unverdünnt	enthalten	30 min	Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan
anti-rat IgG (H&L) + FITC	1:200	-	1 Stunde bei RT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tab. 14: Liste der verwendeten Isotypkontrollen

Isotypkontrolle	Hersteller
murines IgMk	AbD Serotec, Düsseldorf
IgG2A aus Ratte	BD Biosciences, Heidelberg
murines IgG2Ak	BD Biosciences, Heidelberg
murines IgG1	BD Biosciences, Heidelberg
IgG aus Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK

## 2.4. Verwendete Proteine

Tab. 15: Liste der verwendeten Adhäsionsmoleküle zum Beschichten der Kapillarobjektträger

Protein	Verd.	Hersteller
Es wurde eine Chimäre aus rekombinantem humanem E-Selektin und dem konstanten Fragment eines Immunglobulins verwendet. ( <i>rhE-Selectin/Fc Chimera</i> )	1:20	R&D Systems, Minneapolis
Es wurde eine Chimäre aus rekombinantem humanem P-Selektin und dem konstanten Fragment eines Immunglobulins verwendet. ( <i>rhP-Selectin/Fc Chimera</i> )	1:2	R&D Systems, Minneapolis

## 2.5. Verwendete Enzyme

Tab. 16: Liste der verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
Accutase	PAA Laboratories, Cölbe
Dispase II	PAN, Aidenbach
DNase 1	Fermentas, St Leon-Rot
Kollagenase H	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase A	Fermentas, St Leon-Rot

## 2.6. Verwendete RA-Therapeutika

Tab. 17: Liste der verwendeten Biologika und Protease-Inhibitoren

Name	Handelsname	Wirkung	Aufbau	Hersteller
Anakinra	Kineret	IL-1 R-Hemmer	kurze methionisierte Form des h. IL-1R-Antagonisten	Amgen GmbH, München
Bevazizumab	Avastin	VEGF-Hemmer	humanisierter monoklonaler Antikörper	Roche Diagnostik Mannheim
Bortezomib	Velcade	Proteasomen-Hemmer	Tripeptid	Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA
Tocilizumab	RoActemra	IL-6 Hemmer	humanisierter monoklonaler Antikörper	Roche Diagnostik Mannheim

Tab. 18: Liste der verwendeten *disease modifying antirheumatic drugs* (DMARDs)

Name	Handelsname	Hersteller
Prednisolon	Prednisolut® 25 mg L	Milbe GmbH, Brehna
Dexamethason	Dexa 4 mg inject JENAPHARM®	Milbe GmbH, Brehna
Methotrexat	Metex®	Medac GmbH, Wedel

## 2.7. Verwendete Oligonukleotide (*Primer*)

Tab. 19: Liste der verwendeten Oligonukleotide. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich, Taufkirchen erworben und mit einer Konzentration von 100 pmol/ml in dH<sub>2</sub>O gelöst.

Name	Sequenz	Produktlänge
<i>sry-forward</i>	CGGTATTCAACAGCGATGATTACAG	ca. 601 bp
<i>sry-reverse</i>	GTTACCCGATTGTCCTACAGCTTTG	
<i>ALU-forward</i>	TGGCTCACGCCTGTAATCCCA	ca. 170 bp
<i>ALU-reverse</i>	GCCACTACGCCCGGCTAATT	

## 2.8. Verwendete Kits

Tab. 20: Liste der verwendeten Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Peroxidase Substrate Kit AEC</i>	AEC Vector Laboratories, Grünberg
<i>RNeasy Midi Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Master Pure™ Complete DNA and RNA Purification Kit</i>	Epicentre® Biotechnologies, Madison, USA
<i>Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Taq PCR Master Mix Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAamp® DNA Blood Midi Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Human IL-6 Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>peqGOLD 100 bp DNA-Ladder</i>	Peqlab Biotechnologie, Erlangen

## 2.9. Plastikware und sonstige Materialien

Tab. 21: Liste der verwendeten sonstigen Materialien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
15 und 50 ml Reaktionsgefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen
24-well-Transwells	Corning, Amsterdam, Niederlande
25 und 75 cm <sup>2</sup> -Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen
6-, 12- und 48-well-Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Einfrierröhrchen (Cryo.s™)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Erlenmeyerkolben (nicht adhäsiv)	Corning, Amsterdam, Niederlande
Kapillarobjektträger ( $\mu$ -Slide VI <sup>0.1</sup> „ibidiTreat“)	Ibidi, Martinsried
<i>Lab Tek Chamber slides w/Cover (8-well)</i>	Nalge Nunc International, Langenselbold
<i>Microcon Centrifugal Filter Devices (Ultracel Y-100)</i>	Millipore, Schwalbach am Taunus
verschiedene Pipettenspitzen	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Plastikschlauch (Spritzenpumpenleitung, 150 cm)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
steriler Operationsfaden (Seralon® blau Ds-12)	Serag Wiessner, Naila
SuperFrost® Plus Objektträger (OT)	Menzel Gläser, Braunschweig
Zellsieb (Zellstrainer)	BD Bioscience, Heidelberg

## 2.10. Verwendete Geräte

Tab. 22: Liste der verwendeten Geräte

Name	Hersteller
Brutschrank (C150)	Binder GmbH; Tuttlingen
CASY-Cell-Counter (Modell TTC)	Schärfe System GmbH, Reutlingen
CELL-DYN Sapphire	Abbott AG, Baar, Schweiz
CCD-Video-Kamera (CX-77CE)	Sony Corporation, Tokio, Japan
DVD-Recorder (LQ-MD800E)	Panasonic, Osaka, Japan
Geldokumentation (Genius I)	Syngene, Cambridge, UK
Kamera (EOS 350D digital)	Canon Inc., Tokio, Japan
Kryostat (Leica CM 3050S)	Leica Microsystems, Nussloch
Laminarbox (Gelaire BSB4)	Flow Laboratories, Opera, Italien
Mikroskop (Axiovert 200)	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Hamburg
Mikroskop (DM IRB)	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskopkamera (DC 200)	Leica Microsystems, Wetzlar
Modell J2-21 mit Rotor: JA-20 Festwinkelrotor	Beckman Instruments GmbH;
Neubauer-Zählkammer	Superior, Marienfeld
PCR-Gerät (GeneAMP PCR System 9700)	PE Applied Biosystems
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Photometer ( <i>NanoDrop</i> ®)	Peqlab, Erlangen
Rotationsschüttler (Unimax1011)	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttler (Rotamax 120)	Heidolph Instruments, Schwabach
Spannungsquelle (St 504)	Gibco BRL/Invitrogen, Carlsbad, USA
Spritzenpumpe (100CE),	kd Scientific, Holliston, USA
Sunrise ELISA Reader	Tecan, Crailsheim
UV Transluminator (BTS-20.M)	Progen Scientific, London, England
Vertikale Gelelektrophoresekammer (Modell S2)	Gibco, Karlsruhe
Wärmeplatte (OTS 40)	Medite, Burgsdorf
Zytospin Zentrifuge (Cytospin 2)	Shandon Southern Products Ltd., UK

---

## 2.13. Verwendete Software

Tab. 23: Liste der verwendeten Software

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
CapImage	Dr. Zeintl, Heidelberg
Framedriver (Frame Grabber Board Imagenation PXC 200)	Aegis Electronic Group, Inc., Gilbert, USA
IM 1000	Leica Microsystems, Wetzlar
Magellan 5	Tecan, Crailsheim
ND-1000 V3.5.2	peqlab Biotechnologie, Erlangen

---

## 3. METHODEN

### 3.1. Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1. Entnahme der Gewebe

Im Rahmen von Gelenkersatzoperationen wurden in den orthopädischen Abteilungen des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, des Markus-Krankenhauses in Frankfurt sowie des Universitätsklinikums Regensburg in Bad Abbach Synovialgewebe und Knorpel-Knochen-Platten zur Fibroblastenisolierung, Immunhistochemie sowie Knorpelisolierung für SCID-Maus Versuche entnommen. Die Gewebe stammen von Patienten mit nachgewiesener RA oder OA. Die 1987 vom „*American College of Rheumatology*“ (7) ausgewiesenen Kriterien wurden bei den RA-Patienten erfüllt. Die Entnahme erfolgte mit der Genehmigung der Ethikkommissionen der Universitäten Gießen und Regensburg. Von den in der Studie eingeschlossenen Geweben lagen Einverständniserklärungen der Patienten zur Verwendung der Gewebeproben vor.

Des Weiteren wurde SCID-Mäusen alternativ boviner Knorpel implantiert. Die Isolierung des bovinen Knorpels erfolgte aus einem geschlossenen Schultergelenk unter sterilen Bedingungen. Bezogen wurde dieses von einem ortsansässigen Metzger.

Die Isolierung der benötigten EZ erfolgte aus Blutgefäßen (Varizen, Arterien, Venen). Die Gefäße stammten von Operationen zur Krampfaderentfernung (Stripping) oder von Bypass-Operationen der Abteilungen Gefäßchirurgie der William Harvey Klinik in Bad Nauheim sowie der Kardiochirurgie der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim. Von allen Patienten lagen Einverständniserklärungen zur Verwendung der Gefäße vor. Außerdem erfolgte die Entnahme mit der Genehmigung der Ethikkommission der Universität Gießen.

Die Thrombozyten wurden von der Blutbank des Universitätsklinikums Gießen und Marburg bezogen.

#### 3.1.2. Lagerung der Gewebe

Synovialgewebe von OA- und RA-Patienten wurden in Einbettmedium gegeben und über flüssigem Stickstoff eingefroren. Sobald das Einbettmedium komplett durchgefroren war, wurden die Proben in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend langfristig bei -80 °C gelagert.

---

### **3.1.3. Isolierung und Kultur synovialer Fibroblasten**

#### ***3.1.3.1. Isolierung der Synovialen Fibroblasten (SF)***

Das Synovialgewebe wurde nach Entnahme in 0,9% NaCl gegeben, gekühlt und schnellstmöglich weiterverarbeitet, um eine Degradation des Gewebes zu vermeiden. Die Präparation des Synoviums erfolgte unter sterilen Bedingungen. Mit Hilfe eines Skalpells wurde das Gewebe in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke zerkleinert. Für die Isolierung der Zellen aus dem Gewebe erfolgte der enzymatische Abbau durch Inkubation des Gewebes in 10%iger Dispase II für 1 h bei Raumtemperatur (RT) auf einem Schüttler. Um den Verdau zu stoppen, wurden 20 ml Fibroblastenmedium zugegeben. Die Zellsuspension wurde anschließend über ein Zellsieb mit 70 µm Porenweite gegeben, um noch unverdaute Gewebestücke zu entfernen. Die isolierten Zellen wurden 10 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt, die Zellfraktion resuspendiert und je nach Menge in 25 cm<sup>2</sup>- bzw. 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### ***3.1.3.2. Kultivierung und Passage der SF mit DMEM***

Am Tag nach der Isolation und nach weiteren 48-72 Stunden erfolgte ein Medienwechsel. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von ca. 90% erreicht hatten, wurden sie mit PBS gewaschen und für 3 min mit 1 x Trypsin/EDTA inkubiert. Die Reaktion wurde mit Fibroblastenmedium abgestoppt und die Zellsuspension abgenommen. Die Zellen wurden nach der Zentrifugation (10 min bei 300 x g) in Fibroblastenmedium resuspendiert und zur Hälfte (1:2) oder zu einem Drittel (1:3) in neue Zellkulturflaschen verteilt.

#### ***3.1.3.3. Kultivierung der SF mit RPMI***

Die adhärenenten RASF wurden mit 10 ml RPMI überschichtet und bei 37 °C sowie 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte jeden zweiten bis dritten Tag.

#### ***3.1.3.4. Lagerung der Zellen***

SF (ab Passage 2), HUVEC und HUAEC wurden für eine spätere Nutzung kryokonserviert. Dafür erfolgte nach Ablösen und Zentrifugieren der Zellen die Resuspendierung in

---

Einfriermedium. Die Zellen wurden in Einfrierröhrchen überführt, diese langsam auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gekühlt und dort mindestens 24 h gelagert. Am Tag darauf wurden die Zellen in einen mit Stickstoff gefüllten Zelltank transferiert.

#### **3.1.3.5. Auftauen von Zellen**

Für das Auftauen wurden die Zellen in  $37^{\circ}\text{C}$  warmes Wasser gehalten, bis sich das darin befindliche Eis aufgelöst hatte. Die Zellen im Einfriermedium wurden im Anschluss in 5 ml Fibroblastenmedium gegeben und bei  $300 \times g$  abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen im jeweiligen Kulturmedium resuspendiert und ausplattiert.

#### **3.1.3.6. Auszählen der Zellen**

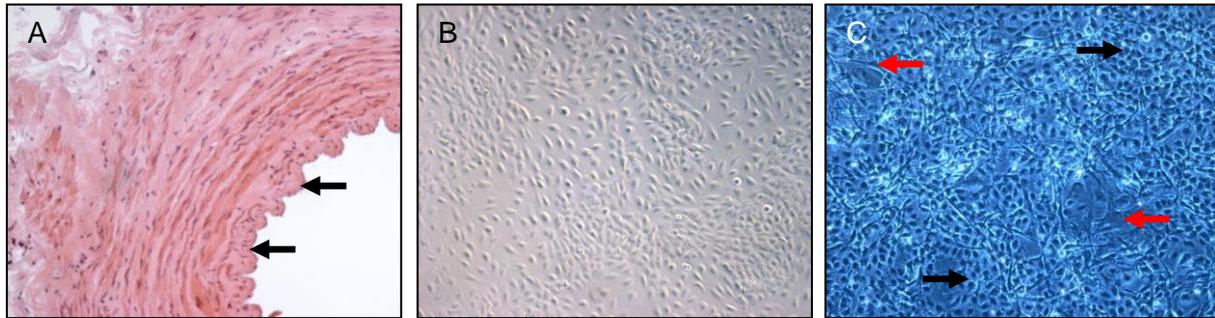
Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die jeweilige Zellsorte in PBS resuspendiert mit Trypanblau versetzt und kurz inkubiert. Die ungefärbten Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Gesamtzellmenge über den Verdünnungsfaktor berechnet.

### **3.1.4. Isolierung und Kultur von Endothelzellen**

#### **3.1.4.1. Isolierung von EZ aus humanen Varizen, Venen oder Arterien**

Die zur Isolierung von EZ benötigten Blutgefäße wurden direkt nach der Entnahme in physiologische Kochsalzlösung gegeben, gekühlt und schnellstmöglich weiterverarbeitet. Um die EZ von der Basallamina zu lösen (siehe Abb. 7 A), wurde das Blutgefäß unter sterilen Bedingungen zweimal mit 10 ml PBS gespült. Die seitlich abgehenden Blutgefäße wurden mit sterilem Operationsfaden abgebunden und ein Ende mit einer Arterienklemme verschlossen. Daraufhin wurde Kollagenase H ins Lumen des Blutgefäßes gefüllt und die andere Seite ebenfalls mit einer Arterienklemme verschlossen. Das so präparierte Blutgefäß wurde in einem sterilen Becherglas für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension mit einer sterilen 1 ml Spitze entnommen und in ein 15 ml-Reaktionsgefäß mit 5 ml Fibroblastenmedium überführt. Zusätzlich wurde das Blutgefäß zweimal mit Fibroblastenmedium gespült, um die restlichen anhaftenden EZ von der Basallamina abzulösen. Nach einer Zentrifugation der Zellen für 10 min bei  $300 \times g$  wurde das Zellpellet in

1 ml Endothelzellmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Vertiefung einer 12-*well*-Platte überführt, welche vorher mit einer RSK-Lösung beschichtet worden war.



**Abb. 7: Primäre Endothelzellen.** (A) Endothelzellen (↔) in einer Varize, Hämalaun und Eosin gefärbter 5  $\mu$ m Schnitt eines kryokonservierten Präparates; (B) Phasenkontrast-Aufnahme einer reinen Endothelzellkultur; (C) Endothelzellkultur (→) mit fibroblastoider Verunreinigung (↔)

#### 3.1.4.2. Beschichtung mit Rattenschwanzkollagen (RSK)-Lösung

Die RSK-Lösung wurde vor jeder Beschichtung frisch angesetzt (Zusammensetzung siehe 2.2.2.). Von der RSK wurde 1 ml in eine Vertiefung einer 12-*well*-Platte und 4 ml in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche gegeben. Die Zellkulturplatte wurde steril 1 h bei RT mit der RSK-Lösung inkubiert.

#### 3.1.4.3. Kultivierung und Passage der isolierten EZ

Die Kultur erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>. Am Tag nach der Isolierung wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gespült und 1 ml frisches Endothelzellmedium zugegeben. Während der Kultur wurde das Medium jeden zweiten oder dritten Tag gewechselt und der Grad der Konfluenz überprüft. Nachdem die Zellen 100% Konfluenz erreicht hatten (siehe Abb. 7 B), wurden sie für 8 min mit 1 x Trypsin/EDTA abgelöst, die Reaktion wurde mit Fibroblastenmedium gestoppt und die Suspension bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Daraufhin wurde die Zellfraktion in 4 ml Endothelzellmedium resuspendiert und auf 4 *wells* einer mit RSK beschichteten 12-*well*-Platte gebracht. Nach dem erneuten Erreichen von 100% Konfluenz wurden die EZ wieder wie zuvor beschrieben vom Plattenboden gelöst und zentrifugiert. Die EZ wurden in eine mit RSK beschichtete 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche wieder bis 100% Konfluenz kultiviert. Da selbstisolierte EZ schon nach wenigen Passagen ihren Phänotyp verändern, wurden diese Zellen nicht kryokonserviert und

nicht über Passage 3 hinaus kultiviert. Die Verunreinigung mit anderen Zelltypen (Abb.7 C) wurde immunzytochemisch mit Antikörper gegen humanes CD31 analysiert, dafür wurden die EZ auf 8-well *Chamber slides* kultiviert.

#### **3.1.4.4. Kultivierung auf Chamber slides**

Zur Untersuchung unterschiedlicher Oberflächenmoleküle wurden Zellen auf 8-well *Chamber slides* kultiviert. Die Zellen wurden dafür mit 1 x Trypsin/EDTA für 4 min inkubiert. Die Enzymreaktion wurde mit Fibroblastenmedium gestoppt und die Zellen bei 300 x g abzentrifugiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen gezählt und mit einer Konzentration von  $5 \times 10^4$  Zellen pro ml in dem entsprechenden Kulturmedium aufgenommen. 100 µl der Zellsuspension wurden in ein *well* des 8-well *Chamber slides* gegeben und bis zur gewünschten Konfluenz (bei RASF 90% und bei EZ 100%) mit dem entsprechenden Kulturmedium kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten bis dritten Tag. Wenn das Grundmedium DMEM war, wurden die Zellen bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> und bei RPMI bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **3.1.5. Stimulierung von RASF mit DNase, RNase, DNS und RNS**

Für die Stimulation wurden RASF wie unter 3.1.3.2. beschrieben abgelöst und zentrifugiert. Danach wurden die RASF ausgezählt und auf eine 6-well-Platte ( $6 \times 10^4$  RASF pro *well*) verteilt. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert. Dann wurden die Zellen für 24 h mit serumreduziertem Medium (2% FCS) kultiviert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und bei 300 x g zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile aus dem Medium zu entfernen. Die parallel kultivierten und behandelten RASF wurden wie in Tabelle 24 dargestellt mit den entsprechenden Medien überschichtet und für 15 Stunden bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert

Tab. 24: Zusammensetzung des RASF-Stimulierungs-Versuchs

Name	Medium	Zusatz
Kontrolle für RNase und DNase	autologes, 24 Stunden vorstimuliertes serumreduziertes Medium (2% FCS)	-
RNase	autologes, 24 Stunden vorstimuliertes serumreduziertes Medium (2% FCS)	5 U/ml (RNase)
DNase	autologes, 24 Stunden vorstimuliertes serumreduziertes Medium (2% FCS)	5 U/ml (DNase)
Kontrolle für RNS und DNS	serumreduziertes Medium (2% FCS)	-
DNS 1	serumreduziertes Medium (2% FCS)	1 µg/ml autologe DNS
DNS 2	serumreduziertes Medium (2% FCS)	25 µg/ml autologe DNS
RNS 1	serumreduziertes Medium (2% FCS)	1 µg/ml autologe RNS
RNS 2	serumreduziertes Medium (2% FCS)	25 µg/ml autologe RNS

Im Anschluss daran wurde der Überstand abgenommen und die IL-6 Konzentration darin mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* gemessen. Die Zellen wurden für 4 min mit Trypsin/EDTA abgelöst, zentrifugiert und in einem definierten Volumen resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und über die entsprechende Verdünnung berechnet.

## 3.2. Färbungen

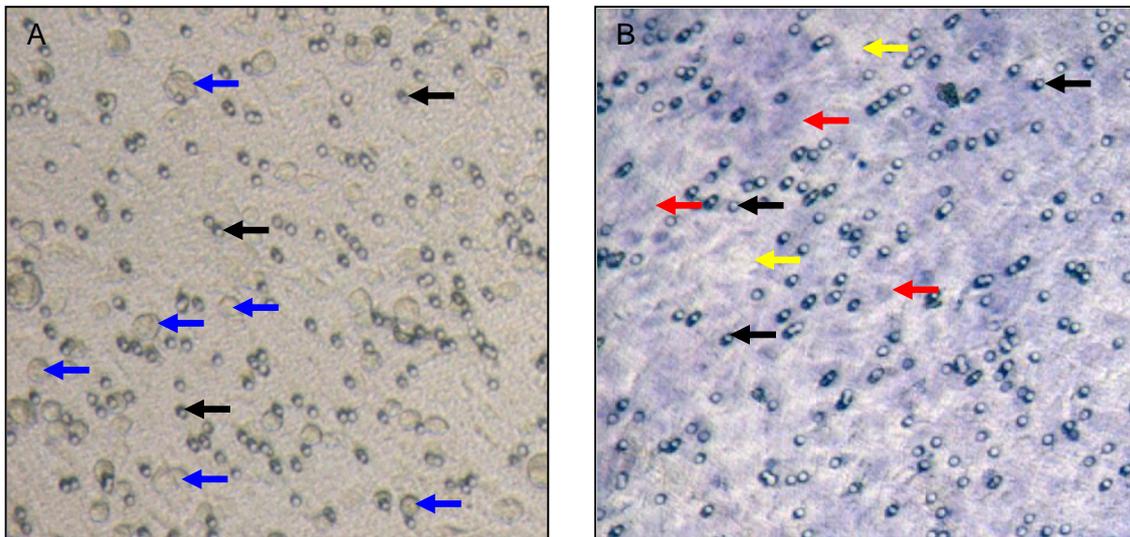
### 3.2.1. Hämalan/Eosin-Färbung (H/E-Färbung)

Um die Strukturen und Zellen im Implantat sichtbar zu machen, wurden die Schnitte jeweils für 10 min mit Hämalan und Eosin gefärbt und in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe, bestehend aus vier Schritten (50%-, 70%-, 96%- und 100%-Ethanol) je 5 Minuten inkubiert, anschließend 3 mal 5 min in Xylol entwässert, mit Entellan und einem Deckglas beschichtet und konserviert.

### 3.2.2. Kristallviolett-Färbung

Auf einen mit EZ beschichteten *Transwell*-Einsatz wurde 1 ml der Kristallviolett-Lösung gegeben und für 20 min bei RT inkubiert, um die Konfluenz der EZ-Schicht zu überprüfen. Im

Anschluss daran wurde die Färbelösung vorsichtig abgenommen, um die EZ-Schicht nicht zu zerstören, und der *Transwell*-Einsatz dreimal mit PBS gewaschen. Danach konnte die Färbung im Mikroskop untersucht und fotografisch mit der im Mikroskop integrierten Kamera dokumentiert werden (Abb. 8).



**Abb. 8: Transwell-Membran mit 8 µm Poren (←) beschichtet mit EZ (←).** (A) EZ auf Transwell-Membran im Phasenkontrast. Die adhärennten Endothelzellen sind nicht zu erkennen. Bei den größeren runden Strukturen (←) handelt es sich um nicht-adhärennte EZ. (B) Mit Kristallviolett gefärbte Membran im Durchlicht. Das Zytoplasma ist deutlich zu erkennen. Die EZ-Schicht in diesem Beispiel ist nicht komplett geschlossen (←).

### 3.3. Anfertigung von Gewebeschnitten

Von den bei -80 °C gelagerten kryokonservierten Geweben wurden mit einem Kryostat 5 µm dicke Gewebeschnitte bei -20 bis -23 °C angefertigt und auf Objektträgern (OT) befestigt. Die Fixierung erfolgte nach einer kurzen Trocknungsphase mit -20 °C kaltem Aceton für 10 min. Danach wurden die OT 30 min im Abzug getrocknet und bei -20 °C gelagert.

### 3.4. Zytospin

Dieses Verfahren wurde verwendet, um Suspensionszellen auf einem OT zu fixieren. Zuerst wurden die Blutzellen nach dem Zentrifugieren mit dem gleichen Volumen an Erythrozyten-Lysepuffer für 4 min inkubiert. Dann wurden die verbleibenden Zellen in Fibroblastenmedium

resuspendiert und erneut bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Die nicht-lysierten Zellen wurden in PBS resuspendiert und in einen trichterförmigen Aufsatz gegeben, der zusammen mit Filterpapier über einen OT in eine Halterung geschoben wurde. Die Zentrifugation mittels einer Zytospin-Zentrifuge erfolgte bei RT für 15 min bei 120 x g. Durch die Zentrifugation wurden die Zellen im Trichter auf den Objektträger geschleudert, während die Flüssigkeit in das saugfähige Papier gedrückt und das Präparat so getrocknet wurde.

### **3.5. Das SCID-Maus Modell**

Mit Hilfe des SCID-Maus Modells kann das Verhalten der RASF *in vivo* untersucht werden, Da SCID-Mäuse nur über ein sehr eingeschränktes Immunsystem verfügen, kann untersucht werden, wie implantierte humane und damit für das Tier speziesfremde RASF auf koimplantierten humanen Knorpel reagieren.

#### **3.5.1. Durchführung des SCID-Maus Modells**

##### **3.5.1.1. Vorbereitung der Implantate**

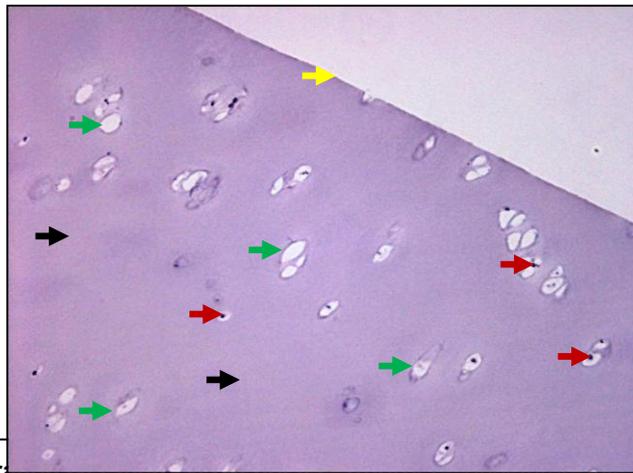
###### *Vorbereitung der SF*

Zuerst wurden die humanen Fibroblasten aufgetaut und unter Standardbedingungen kultiviert. Das Medium wurde während dieser Zeit dreimal pro Woche gewechselt. Nachdem die Zellen mit Trypsin abgelöst, bei 300 x g zentrifugiert und gezählt worden waren, wurde der Überstand verworfen und die Zellen in steriler 0,9% NaCl-Lösung resuspendiert. Es wurden pro Implantat  $5 \times 10^5$  SF in 50  $\mu$ l steriler Kochsalzlösung in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben.

###### *Vorbereitung des Knorpels*

Der für das SCID-Maus Modell verwendete Knorpel stammte von OA-Patienten, denen beim Einsetzen einer Knie-Totalendoprothese Gewebe entnommen wurde. Um die Qualität des Knorpels zu bewahren, wurde dieser nach Entnahme der Knochen-Knorpel-Platten des Kniegelenks gekühlt in 0,9% NaCl-Lösung transportiert. Alternativ wurde boviner Knorpel verwendet, der innerhalb der ungeöffneten Kapsel und deshalb steril ins Labor gebracht

wurde. Dort wurde das bovine Gelenk unter sterilen Bedingungen geöffnet und der Knorpel entnommen. Der bovine bzw. humane Knorpel wurde auf seine makroskopische Beschaffenheit hin untersucht, da nur gesund aussehender und von der Oberflächenbeschaffenheit glatter Knorpel für das SCID-Maus Modell verwendet wurde. Nach der makroskopischen folgte eine mikroskopische Begutachtung. Hierfür wurde ein Stück des Knorpels in Einbettmedium gegeben und über flüssigem Stickstoff eingefroren. Es wurden 5 µm dicke Schnitte des Gewebes angefertigt, die mit Hämalaun angefärbt wurden. Im Mikroskop erfolgte die Begutachtung der Beschaffenheit der Knorpelmatrix, der Lakunen und der Chondrozyten. Wichtige Kriterien für den Knorpel der im SCID-Maus Modell eingesetzt werden konnte, sind in Abb. 9 dargestellt.



**Abb. 9: Für einen Migrationsversuch verwendeter Knorpel.** Angefärbt mit Hämalaun in 100facher Vergrößerung. Die Pfeile weisen auf Charakteristika hin, die einen für eine SCID-Maus-Operation geeigneten Knorpel ausmachen. Dazu gehören die einheitlich gefärbte Knorpelmatrix (→), klar abgrenzbare Chondrozytenhöfe (→), klar abgrenzbare und kleine Chondrozytenkerne (→) und glatte Knorpelränder (→).

#### *Vorbereitung der Gelatinematrix und Präparation der Implantate*

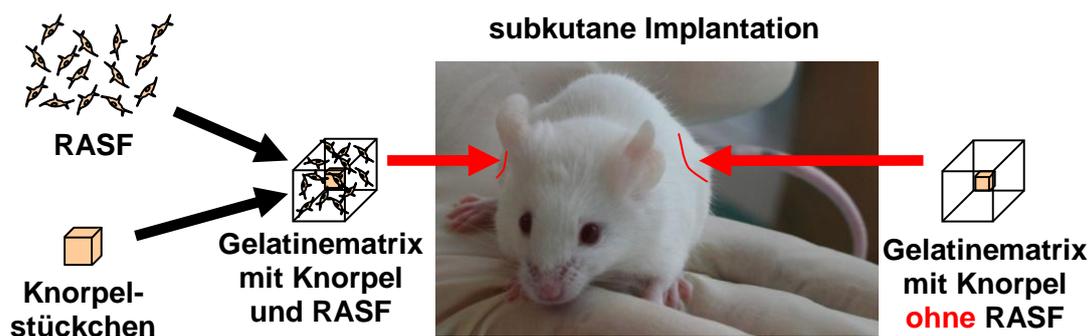
Die Trägermatrix wurde unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell in würfelförmige, ca. 3-5 mm<sup>3</sup> große Stücke zerteilt. Anschließend wurden die Knorpelstücke in die Mitte der Gelatinematrix eingesetzt. Die so entstandenen Konstrukte wurden für die ipsilateralen Implantate in die Reaktionsgefäße mit den SF in 50 µl 0,9% NaCl-Lösung gegeben. Für die kontralateralen Implantate wurde die Gelatinematrix mit dem Knorpelstück in NaCl ohne Zellen gegeben (siehe Abb.10).

### 3.5.1.2. Narkose der Tiere

Zur Narkose der circa 4 bis 6 Wochen alten SCID-Mäuse wurde den Tieren eine Mischung aus 100 mg/kg Lebendgewicht (LG) Ketamin und 15 mg/kg LG Xylazin in 0,9 % NaCl-Lösung intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Die Narkosedauer betrug in Abhängigkeit von der individuellen Variation der Tiere 15-30 min.

### 3.5.1.3. Einsetzen der Implantate in die SCID-Mäuse

Die Implantation der Konstrukte aus Gelatinematrix mit Knorpel mit (ipsilateral) oder ohne (kontralateral) SF wurde nach der „Inverse wrap-Methode“ (43) durchgeführt. Dafür wurde, nachdem kein Zwischenzehen-Reflex mehr feststellbar und kein Schmerzempfinden nachweisbar war, die Hautstelle desinfiziert und ein ca. 5 mm langer Schnitt in die Haut der Flanke einer SCID-Maus gesetzt. Das Bindegewebe zwischen der Kutis und dem Peritoneum wurde durchtrennt und eine Hauttasche im Gewebe präpariert. Das Peritoneum wurde dabei nicht verletzt. Das Konstrukt aus Gelatinematrix mit Knorpel und SF wurde in der Tasche auf der ipsilateralen Seite platziert. In die Tasche auf der kontralateralen Seite wurde die Gelatinematrix mit Knorpel ohne SF eingebracht. Anschließend wurde der Schnitt mit drei bis vier Stichen mit sterilem Operationsfaden verschlossen und die Mäuse bis zum Aufwachen auf eine Wärmeplatte mit 37 °C gelegt.



**Abb. 10: Das SCID-Maus Modell der RA.** Die RASF wurden zusammen mit humanem Knorpel innerhalb einer Gelatinematrix ipsilateral subkutan implantiert. Kontralateral wurde nur der humane Knorpel in der Gelatinematrix ohne RASF implantiert (nach 43).

### **3.5.1.4. Entnahme der Implantate**

Die SCID-Mäuse wurden nach Ablauf der Versuchszeit (1,5–60 Tage) getötet, indem sie zuerst wie unter 3.5.1.2. beschrieben narkotisiert und im Anschluss entblutet wurden. Das Blut wurde steril mit einer Spritze entnommen, die 200 µl Heparin enthielt, um die Gerinnung zu verhindern. Im Anschluss daran wurde das Blut gekühlt und bei 1200 x g zentrifugiert, um das Plasma von den Blutzellen zu trennen. Das Plasma wurde für weitere Analysen bei -20 °C gelagert. Die Blutzellen wurden entweder direkt für einen Zytospin oder zur DNS-Isolation verwendet. Um die Gefäßneubildung zu dokumentieren, wurden die Implantate vor ihrer Entnahme freigelegt, jedoch nicht von der Haut abgelöst, und fotografiert. Danach wurden beide Implantate sowie eine Niere und die Milz entnommen. Die Implantate und die Organe wurden sofort nach der Entnahme in Einbettmedium gegeben, über flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### **3.5.1.5. Auswertung der Invasion**

Von den eingebetteten und tiefgefrorenen Implantaten wurden 5 µm Serienschnitte angefertigt (siehe 3.3.) die einen Überblick über die Invasion der RASF und die perichondrozytäre Knorpeldegradation der Knorpelmatrix geben sollten. Die Schnitte wurden nach der H/E-Färbemethode (siehe 3.2.1.) angefärbt und von repräsentativen Schnitten wurden am Mikroskop Fotos in hundertfacher und zweihundertfacher Vergrößerung aufgenommen. Die Auswertung der Implantate erfolgte durch vier bis fünf geübte Mitarbeiter des Labors nach der folgenden Skala für die RASF-Invasion und die perichondrozytäre Knorpeldegradation.

#### *Invasions-Skala:*

- 0 = keine Invasion
- 1 = sichtbare Invasion (2 Zelltiefen)
- 2 = Invasion (5 Zelltiefen)
- 3 = tiefe Invasion (> 10 Zelltiefen)

---

*Perichondrozytäre Knorpeldegradations-Skala:*

- 0 = keine Degradation (schaf umrandete, intakte Chondrozytenhöfe und gleichmäßige Matrixfärbung)
- 1 = leichte Degradation (Matrixveränderungen in einem Durchmesser eines Chondrozytenhofs)
- 2 = sichtbare Degradation (Matrixveränderungen in einem bis zwei Durchmessern der Chondrozytenhöfe)
- 3 = intensive Degradation und Matrixveränderungen (> zwei Durchmesser der Chondrozytenhöfe)

### **3.5.2. Zeitverlauf der RASF-Migration im SCID-Maus Modell**

Die Analyse des Ablaufs der RASF-Migration im SCID-Maus Modell war ein wichtiger Teil der Doktorarbeit. Im SCID-Maus Modell sollten mit dem Zeitverlauf verschiedene Parameter analysiert werden. Dazu gehörten:

- 1.) die Analyse der zeitlichen Abläufe der Gefäßbildung.
- 2.) die zeitliche Einordnung der Transmigration der RASF ins Blutgefäßsystem.
- 3.) die zeitabhängige Quantifizierung der RASF im Blut.
- 4.) die Eingrenzung des Zeitpunktes der ersten Transmigration der RASF aus dem Blutgefäßsystem heraus.
- 5.) die Darstellung des Invasions- und Degradationsverlaufs im SCID-Maus Modell.

Die SCID-Mäuse wurden, wie unter 3.5.1. beschrieben, operiert und der SCID-Maus Versuch wurde zu unterschiedlichen Zeiten, wie unter 3.5.1.4. und 3.5.1.5. beschrieben, beendet und ausgewertet.

### **3.5.4. Das SCID-Maus Modell mit E- und P-Selektin-defizienten Mäusen**

Der Effekt von E- bzw. P- Selektin auf das Transmigrationsverhalten der RASF sollte *in vivo* analysiert werden. Dafür wurde die Migration der RASF sowie die Invasion im SCID-Maus-Modell zwischen E- und P-Selektin-defizienten und E- und P-Selektin normal exprimierenden SCID-Mäusen verglichen. Die E- und P-Selektin-defizienten SCID-Mäuse wurden uns freundlicherweise von dem Institut für Anatomie II des Universitätsklinikums Eppendorf zur Verfügung gestellt. Aufgrund der limitierten Tierzahl wurden Tiere beiderlei Geschlechts verwendet. Im Vergleich dazu wurden E- und P-Selektin normal exprimierende

SCID-Mäuse parallel behandelt. Es wurden zwei Experimente durchgeführt. Das erste Experiment lief über einen Zeitraum von 60 Tagen und das zweite über einen Zeitraum von 45 Tagen. Der Tierversuch wurde wie unter 3.5.1. beschrieben durchgeführt. Nach Ablauf des jeweiligen Versuchszeitraums wurden die Experimente, wie unter 3.5.1.4. und 3.5.1.5. beschrieben, beendet und ausgewertet.

### 3.5.3. Therapeutisch wirksame Substanzen im SCID-Maus Modell

Die Wirkung von DMARDs, Biologika, Protease-Inhibitoren sowie von RNase und DNase auf das Migrationsverhalten der RASF wurde untersucht, indem die SCID-Mäuse wie unter 3.5.1. beschrieben nach der „inverse wrap“ Methode operiert und ab dem Tag danach mit verschiedenen Medikamenten behandelt wurden (Tab 25). Der Versuchszeitraum betrug entweder 45 oder 60 Tage. Als Kontrolle diente bei jedem Experiment gewichtsabhängig applizierte NaCl-Lösung.

**Tabelle 25: Schema der Medikament-Applikation**

<b>Name des Medikaments</b>	<b>eingesetzte Konzentration</b>	<b>Injektionsintervall</b>	<b>Appikationsart</b>	<b>Tierzahl</b>
Anakinra	1,25 µg/g LG	dreimal wöchentlich	i.p.	8
Bevacizumab	5 µg/g LG	einmal wöchentlich	i.p.	6
Bortezomib	1 µg/g LG	Tag 1, 3, 6, 10 und 14, dann folgte eine 10-tägige Pause und der Zyklus begann erneut	i.p.	6
Dexamethason	0,5 µg/g LG	zweimal wöchentlich	i.p.	6
DNase	42 ng/g LG	dreimal wöchentlich	i.v.	7
Methotrexat	1 µg/g LG	zweimal wöchentlich	i.p.	6
Prednisolon	4 µg/g LG	zweimal wöchentlich	i.p.	6
RNase	42 ng/g LG	dreimal wöchentlich	i.v.	10
Tocilizumab	8 µg/g LG	einmal wöchentlich	i.p.	14

Die Beendigung und Auswertung des Experiments erfolgte wie unter 3.5.1.4. und 3.5.1.5 beschrieben. Die Gefäßeinsprossung in die Implantate wurde fotografisch festgehalten. Das Plasma und die Zellen des Blutes wurden wie unter 3.5.1.4. beschrieben bei -20°C gelagert.

## 3.6. Molekularbiologische Methoden

### 3.6.1. DNS-Isolierung

Aus den, wie unter 3.5.1.4. beschrieben, gewonnenen Blutzellen sowie aus den für den SCID-Maus-Versuch verwendeten RASF wurde die DNS mit Hilfe des *QIAamp® DNA Blood Midi Kits* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Die DNS-Isolierung aus RASF erfolgte, indem die Zellen von zwei 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen abgelöst, zentrifugiert und im Anschluss in 2 ml PBS aufgenommen wurden. Nach der Isolierung wurde die DNS-Konzentration mit Hilfe des *NanoDrop®* photometrisch durch Messen der Absorption bei 260 nm ermittelt. Die Lagerung der isolierten DNS erfolgte bei -20°C.

### 3.6.2. Polymerase-Kettenreaktion

#### 3.6.2.1. Amplifikation des sex determining region of Y (*sry*)-Gens

Um die männliche humane DNS im Blut der weiblichen SCID-Maus nachzuweisen, wurde das *sry*-Gen mittels *Polymerase Chain Reaction* (PCR) amplifiziert. Dabei handelt es sich um ein Gen auf dem Y-Chromosom, welches in männlichen RASF zu finden ist, nicht jedoch in den Zellen der weiblichen SCID-Mäuse. Vor der Verwendung in der PCR wurde das Volumen der DNS-Proben mit Hilfe von *Microcon Centrifugal Filter Devices* eingeeengt. Als Positivkontrolle wurde DNS eingesetzt, die aus den kultivierten RASF gewonnen wurde. Die generelle Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes ist Tabelle 26 zu entnehmen.

Tab. 26: Zusammensetzung der PCR-Ansatz der Amplifikation des *sry*-Gens

Substanz	Menge
DNS (Positivkontrolle)	2,5 µl
DNS (Proben)	944,44 ng
Oligonukleotid-Primer <i>sry forward</i> (10 µmol)	1,5 µl
Oligonukleotid-Primer <i>sry reverse</i> (10 µmol)	1,5 µl
<i>Taq-Mastermix</i> ( <i>Taq PCR Master Mix Kit</i> )	15 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 30 µl

Für die Amplifikation wurde folgendes Programm verwendet:

Tab. 27: PCR-Programm zur Amplifizierung des *sry*-Gens im murinen Blut.

Temperatur in °C	Zeit in min	Zyklus
95	10	1x
95	1	45x
57	1	
72	1	
72	10	1x
4	∞	

Der Erfolg der PCR-Reaktion wurde durch Elektrophorese eines 15 µl Aliquots in einem Agarosegel überprüft.

### 3.6.2.2. Amplifikation der humanen ALU-Sequenzen

Als alternativer Nachweis der humanen DNS im murinen Blut wurde die Amplifikation der humanen ALU-Sequenzen (75), die im murinen Genom nicht vorkommen verwendet. Dafür wurde DNS wie unter 3.6.1. beschrieben isoliert und in einer PCR eingesetzt (Tabelle 28).

Tab. 28: Zusammensetzung der PCR-Ansätze

Substanz	Menge
DNS (Positivkontrolle)	2,5 µl
DNS (Proben)	101,28 ng
Oligonukleotid-Primer ALU <i>forward</i> (10 µmol)	1,5 µl
Oligonukleotid-Primer ALU <i>reverse</i> (10 µmol)	1,5 µl
<i>Taq-Mastermix</i> aus dem <i>Taq PCR Master Mix Kit</i>	15 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 30 µl

Zur Amplifizierung der DNS wurde folgendes Programm verwendet:

Tab. 29: PCR-Programm zur Amplifizierung der ALU-Sequenzen im murinen Blut.

Temperatur in °C	Zeit in min	Zyklus
95	3	1x
95	0,5	30x
67	0,5	
72	1	
72	10	1x
4	∞	

Der Erfolg der PCR-Reaktion wurde durch Elektrophorese eines 15 µl Aliquots in einem Agarosegel überprüft.

### 3.6.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse der DNS im Anschluss an eine PCR erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese in einem 1,5 %igen (w/v) Gel unter Verwendung von 1 x TAE-Puffer. Zum späteren Nachweis wurde das Gel mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) versetzt. 15 µl der zu analysierenden PCR-Probe wurden mit 2 µl 6 x Ladebuffer (*peqGOLD 100 bp DNA-Ladder* Kit) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente die *peqGOLD 100 bp DNA-Ladder* (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen). Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 80 mV für 25 min. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Nukleinsäuren im Gel mittels UV-Licht visualisiert und fotografisch dokumentiert.

### 3.6.4. Messung der RNS im Zellkulturüberstand

Isolierte Fibroblasten wurden hierzu in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 85–90% kultiviert. Nach der Stimulierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit serumfreiem Medium für 24 h inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen. 1,5 ml Überstand wurde mit 1,5 µl RNase-Inhibitor versetzt und für die Bestimmung der Konzentration der extrazellulären RNS sofort bei -80 °C weggefroren. Um die Konzentration der exRNS bzw. exRNase der verschiedenen Fibroblasten vergleichen zu können, wurde nach der Zellzahlbestimmung eine Hälfte der Zellen mit Protein-Lysepuffer und die andere Hälfte mit RNS-Lysepuffer lysiert. Die Lysate wurden bis zur weiteren

Verwendung bei -80 °C gelagert. Die exRNS wurde zuerst mit dem *Master Pure™ Complete DNA and RNA Purification Kit* aufgereinigt und mit dem *Quant-iT™ RNA Assay Kit* quantifiziert.

## 3.7. Immunologische Methoden

### 3.7.1. Immunhisto- und immunzytochemische Färbungen

Für die immunhisto- oder immunzytochemische Färbung wurden die bei -20 °C gelagerten Aceton fixierten Schnitte für 8 min aufgetaut und 5 min in PBS gewässert. Die zu untersuchenden Bereiche wurden im Anschluss daran mit einem Block-Reagenz für eine Stunde bei RT inkubiert (siehe Tabelle 12), um unspezifische Bindungen zu verhindern. Das Block-Reagenz wurde vorsichtig abgenommen und das Gewebe mit 100 µl einer Verdünnung des Primärantikörpers überschichtet (siehe Tabelle 12). Für die Isotypkontrolle wurden 100 µl der gleichen Konzentration eines unspezifisch bindenden Antikörpers gleichen Isotyps verwendet (siehe Tabelle 14). Auf dem OT für die Negativ- und die Reagenzkontrolle wurde das Block-Reagenz belassen. Die Ansätze wurden in einer feuchten Kammer antikörperabhängig inkubiert (siehe Tabelle 12). Daraufhin wurden die OT dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die im Gewebe befindliche Peroxidase-Aktivität gehemmt, indem die OT für 30 min mit 4 °C kaltem Methanol mit 0,3% Wasserstoffperoxid inkubiert wurden. Danach folgte ein dreimaliges Waschen in PBS für je 5 min und eine antikörperabhängige Inkubation der Probe, der Isotypkontrolle und der Reagenzkontrolle mit dem sekundären Antikörper in einer feuchten Kammer. Auf den OT mit der Negativkontrolle wurde während der Inkubation nur das Block-Reagenz ohne Antikörper gegeben. Als sekundärer Antikörper wurde Histofine® mit entsprechender Speziesreaktivität verwendet, das an den Primärantikörper bindet (siehe Tabelle 13). Danach folgte ein dreimaliger Waschschrift mit je 5 min in PBS. Als Substrat für die Peroxidase-Reaktion wurde das *Peroxidase Substrate Kit AEC* nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Farbreaktion im Gewebe wurde am Mikroskop im Durchlicht verfolgt und nach ausreichender Entwicklung in PBS gestoppt. Die Proben wurden mit Aquatex® und einem Deckgläschen fixiert und nach dem Trocknen wurden die Farbreaktionen fotografisch dokumentiert und die OT bei RT dunkel gelagert.

### *Überprüfung der Reinheit der EZ-Kultur mit CD31*

Die Reinheit einer EZ-Kultur wurde in Passage 2 mit einem Antikörper gegen humanes CD31 immunzytochemisch überprüft. Dafür wurden die Kulturen auf *8-well Chamber slides* mit einer Konfluenz von 100% mit anti-humanen CD31-Antikörpern immunzytochemisch angefärbt. Hierfür wurden der Überstand sowie die Plastikwände und das Silikon des *Chamber slides* entfernt und der OT 5 min getrocknet. Im Anschluss wurde der OT für 10 min in -20 °C kaltem Aceton fixiert und bei -20 °C gelagert. Für die Färbung wurde die unter 3.7.1. dargestellte immunzytochemische Methode genutzt. Als Blockingreagenz wurde 5% Milchpulver verwendet, der primäre Antikörper war anti-humanes CD31 (siehe Tabelle 12), für die Isotypkontrolle (siehe Tabelle 14) wurde murines IgG2A mit der gleichen Konzentration und als sekundärer Antikörper wurde Histofine® (siehe Tabelle 13) verwendet.

### **3.7.2. Immunfluoreszenz-Färbung**

Bei der Immunfluoreszenz wurde im Prinzip die unter 3.7.1. beschriebene Methode verwendet. Der Schritt mit dem *Peroxidase Substrate Kit AEC* entfiel, da Fluorochromgekoppelte sekundäre Antikörper verwendet wurden. Es folgte zusätzlich ein Schritt zur Kernmarkierung, bei dem 1 µl der DAPI-Stammlösung (siehe 2.2.2.) in 5 ml Methanol gelöst und auf das zu färbende Gewebe gegeben wurde. Die OT wurden für 10 min dunkel inkubiert und das überschüssige DAPI durch dreimaliges Waschen für je 5 min im PBS entfernt. Nach der Kernfärbung wurden die Gewebe sofort mit Einbettmedium (DAKO® *Fluorescent Mounting Medium*, DAKO Corporation Carinteria, CA, USA) fixiert und im Anschluss mit dem Mikroskop im Fluoreszenzlicht ausgewertet und repräsentative Bereiche fotografisch dokumentiert. Die Fluoreszenz-markierten Gewebe wurden bei 4 °C gelagert und waren ca. ein bis zwei Monate haltbar.

### **3.7.3. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Die Konzentration des murinen IL-6 wurde im Plasma der SCID-Mäuse mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt. Der *Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit* (R&D Systems, Wiesbaden) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. SCID-Mäuse mit erhöhter IL-6 Konzentration im Plasma wurden aus der Auswertung ausgeschlossen, da sie ihr Immunsystem teilweise wiedererlangt haben könnten.

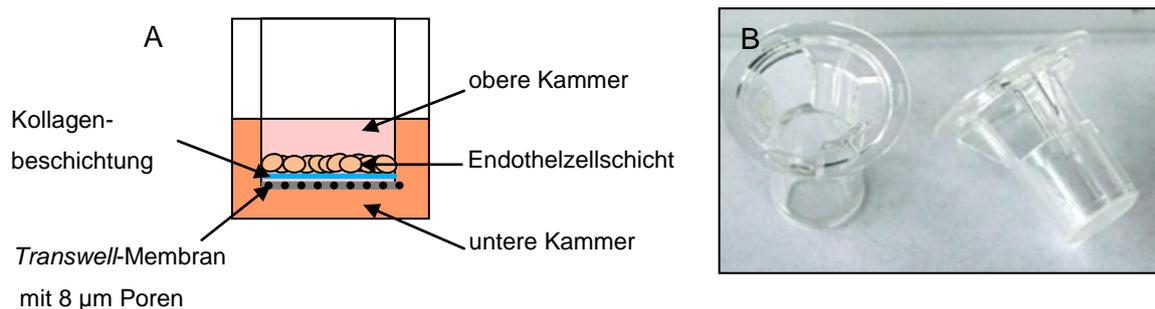
## 3.8. Funktionelle Assays

### 3.8.1. Transmigrationsassay

Für die Analyse der RASF-Transmigration durch eine geschlossene EZ-Schicht wurden zuerst die *Transwell*-Einsätze mit HUVECs beschichtet und die Zellen für 4 Tage bis zur 100%igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die RASF in die obere Kammer (siehe Abb. 11 A) auf die EZ-Schicht gegeben und die RASF, die nach einer definierten Zeit in die untere Kammer transmigriert waren, ausgezählt.

#### 3.8.1.1. *Transwell*beschichtung mit EZ

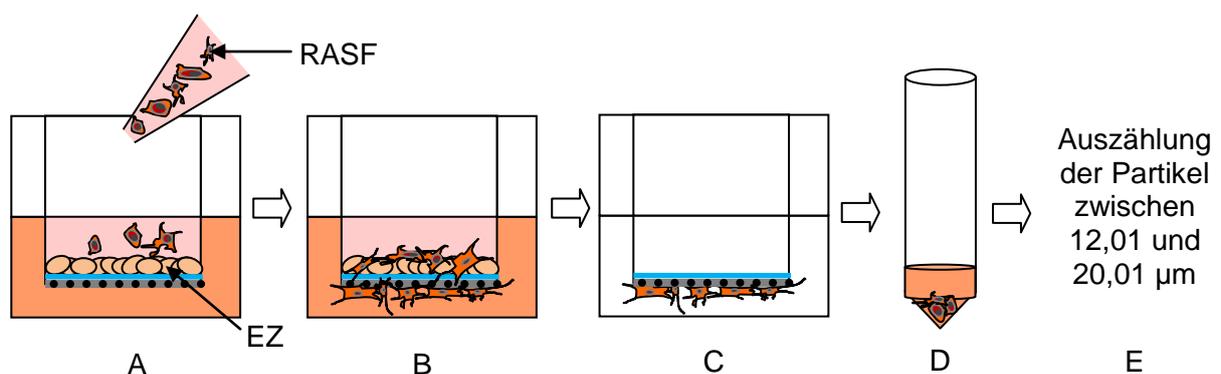
Die Membran der *Transwell*-Einsätze (24-well-Format mit 8 µm Poren) wurde unter sterilen Bedingungen mit 100 µl RSK (wie unter 3.1.4.2. beschrieben) beschichtet, um eine bessere Adhäsion der EZ zu gewährleisten sowie zur Erzeugung einer künstlichen Basallamina. Im Anschluss daran wurden jeweils  $1 \times 10^5$  der humanen EZ (siehe Tabelle 7) in einem Volumen von 100 µl HUVEC-Medium (bei HUVECs oder HUAECs) oder Endothelzellmedium (bei VEC, HVE oder HAE) resuspendiert und in je einen *Transwell*-Einsatz (siehe Abb. 11 B) gegeben. Die untere Kammer enthielt 650 µl des selben Mediums. Die Zellen wurden für 4 Tage bis zur 100%igen Konfluenz bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die Konfluenz der EZ-Schicht wurde mit einer Kristallviolett färbung überprüft (siehe 3.2.2.).



**Abb. 11: Aufbau des Transmigrationsassays.** (A) Zusammensetzung des Transmigrationsassays; (B) Foto von *Transwell*-Einsätzen.

### 3.8.1.2. Transmigration und Auswertung

Die kultivierten RASF wurden mit Accutase für 4 min behandelt und so vom Kulturboden abgelöst. Die Reaktion wurde mit Fibroblastenmedium gestoppt und die RASF wurden bei 300 x g abzentrifugiert, ausgezählt und  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in serumreduziertem Medium (2% FCS) resuspendiert. Nachdem eine 100% konfluente EZ-Schicht festgestellt worden war, wurde der Überstand im *Transwell*-Einsatz abgenommen und durch 100  $\mu$ l der Fibroblasten-Suspension ersetzt (Abb. 12 A). Der *Transwell*-Einsatz wurde in ein neues *well* mit 650 ml Medium gegeben und die Zellen bei 37 °C bei 10% CO<sub>2</sub> inkubiert (Abb. 12 B). Nach Beenden der Inkubationszeit wurde jeder *Transwell*-Einsatz in ein neues *well* mit 650  $\mu$ l PBS gegeben, das Medium aus der oberen Kammer abgesaugt und durch 100  $\mu$ l PBS ersetzt. Das Medium der unteren Kammer wurde entnommen mit 5 ml Fibroblastenmedium versetzt und durch 650  $\mu$ l Trypsin/EDTA ersetzt (Abb. 12 C). Die *Transwell*-Einsätze wurden in die *wells* mit Trypsin/EDTA gegeben um die an der Unterseite der *Transwell*-Membran befindlichen Fibroblasten abzulösen. Die Trypsin/EDTA-Lösung mit den darin befindlichen RASF wurde ebenfalls gesammelt. Dieser Ablauf wurde zweimal wiederholt, um möglichst alle Fibroblasten abzulösen. Die Zellen wurden bei 300 x g für 10 min zentrifugiert (Abb. 12 D) und der Überstand entfernt. Die RASF wurden nun in 200  $\mu$ l Fibroblastenmedium resuspendiert und die Anzahl der transmigrierten RASF mittels Zellzähler (*CASY Cell-Counter*) nach Angaben des Herstellers (Abb. 12 E) ermittelt.



**Abb. 12: Ablauf des Transmigrationsassays mit anschließender Auswertung.** (A) Zugabe der RASF auf eine konfluente EZ-Schicht; (B) Transmigration der RASF durch EZ-Schicht; (C) Ablösen der RASF von der Membranunterseite des *Transwell*-Einsatzes; (D) Entfernen des Trypsins und Einengen des Volumens durch Zentrifugation; (E) Quantifizieren der transmigrierten RASF.

### **3.8.2. Zell-Zell-Bindungsversuch**

#### **3.8.2.1. Anfärben der RASF mit Calcein-AM**

Um die RASF von den EZ unterscheiden zu können, wurden die RASF mit Calcein-AM angefärbt. Dieser Farbstoff ist der außerhalb der Zellen farblos. Im Zytoplasma lebender Zellen wird das Calcein-AM mit Hilfe einer Esterase in Calcein und einen Acetoxymethylester-Rest gespalten. Das fluoreszierende Calcein kann dann im Zytoplasma nach Anregung mit Licht im Bereich von 495 nm als grünes Signal wahrgenommen werden. Für die Färbung wurde ein Vial Calcein-AM nach Herstellerangaben in sterilem DMSO gelöst. Von dieser Lösung wurden 2 µl auf 1 ml serumfreies Medium gegeben. Die Fibroblasten wurden 30 min in dem Färbemedium inkubiert und danach zweimal mit PBS gewaschen, um das außerhalb der Zellen befindliche Calcein-AM zu entfernen. Die Zellen wurden im Anschluss mit Accutase abgelöst, die Reaktion mit Fibroblastenmedium gestoppt und die Zellen bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in einem definierten Volumen aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

#### **3.8.2.2. Adhäsion, Ablösen der Zellen und Auswertung**

5 x 10<sup>3</sup> SF in 200 µl Medium wurden auf die EZ-Schicht pipettiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Medium der RASF durch serumreduziertes Medium ersetzt und die 48-well-Platte bei maximaler Frequenz ohne Intervall 5 min geschüttelt. Das Erneuern des Mediums und das Schütteln wurden zweimal wiederholt. Anschließend erfolgte die Analyse der adhärenen RASF an den EZ, indem von jedem well vier Fotos von repräsentativen Bereichen gemacht wurden. Die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen pro Gesichtsfeld wurde im Anschluss ausgezählt und statistisch ausgewertet.

### **3.8.3. Flusskammerversuch mit SF**

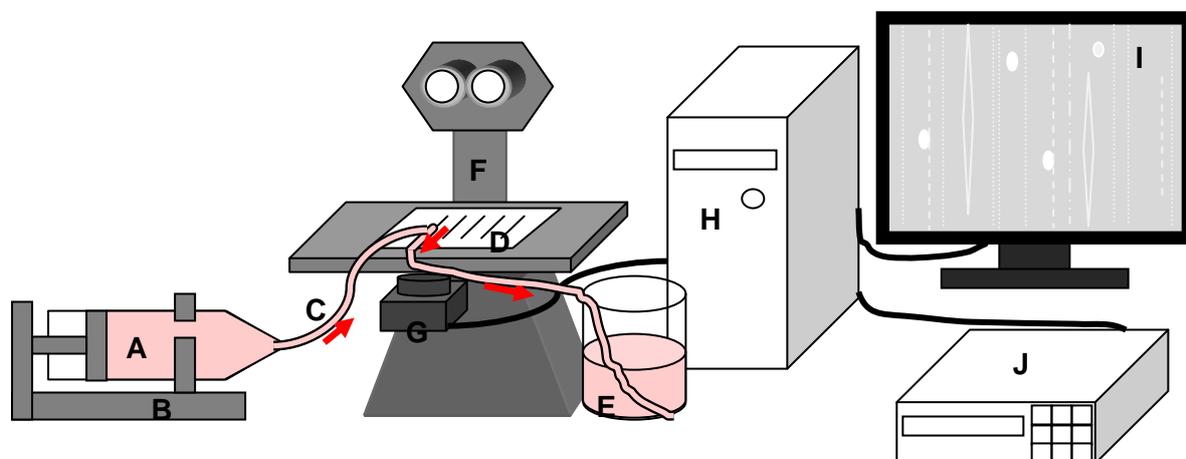
#### **3.8.3.2. Beschichtung der Kapillarobjektträger und der weiterer Materialien**

Um die Kapillarobjektträger mit den zu untersuchenden Oberflächenmolekülen zu beschichten, wurden die Kapillaren jeweils mit einer 1:2 Verdünnung von *rhP-Selectin/Fc Chimera* in PBS oder mit einer 1:20 Verdünnung von *rhE-Selectin/Fc Chimera* in PBS oder als Negativkontrolle mit FCS bestückt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Um die Adhäsion

der Zellen aus der Suspension an die Plastikschauch- (Spritzenpumpenleitung, 150 cm, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg) und der Spritzenwand so gering wie möglich zu halten, wurden diese für den Flusskammerversuch verwendeten Materialien für 30 min mit dem jeweiligen Medium ohne Zellen vorinkubiert.

### 3.8.3.3. Durchführung des Flusskammerversuchs

Nach Vorbereitung der Kapillaren und der anderen Materialien wurde das zellfreie Medium aus der Spritze durch 20 ml der resuspendierten Zellsuspension ersetzt. Die Spritze wurde in eine Spritzenpumpe (kd Scientific 100CE, Holliston, USA) eingespannt und das Flüssigkeitsvolumen sowie die gewünschte Flussrate eingegeben, um eine konstante Scherkraft zu gewährleisten. Der Schlauch der Spritze wurde an eine Seite einer Kapillare auf dem Kapillarobjektträger gesteckt (siehe Abb. 13). Ein weiterer, leerer Schlauch wurde mit der anderen Seite der Kapillare und mit einem Abfallgefäß verbunden (siehe Abb. 13). Der Kapillarobjektträger wurde auf den Objektträgertisch eines inversen Mikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Hamburg) gelegt und der Zellfluss durch die Kapillare wurde über einen Monitor verfolgt. Die an dem Mikroskop befestigt CCD-Video-Kamera transferierte die Bilder an einen DVD-Recorder, wodurch das analoge Signal mit Hilfe eines Programmes (Framedriver; Frame Grabber Board Imagenation PXC 200) digitalisiert und gespeichert werden konnte. Die Auswertung der adhärennten oder verlangsamt rollenden Zellen erfolgte mit dem CapImage-Program. Dabei wurden durch das Programm Hilfslinien erzeugt und das deutliche Signal der adhärennten oder verlangsamt rollenden Zellen gemessen und gespeichert.



**Abb. 13:** Schematische Darstellung des Aufbaus des Flusskammerversuchs. A: Spritze mit Zellsuspension; B: Spritzenpumpe; C: Schlauch mit Zellsuspension; D: Kapillar-Objektträger; E: Abfallgefäß; F: Mikroskop; G: Kamera; H: Computer; I: Bildschirm; J: DVD-Recorder; → : Flussrichtung der Zellsuspension

### 3.8.4. Schüttelversuch

Dieses Experiment sollte die für die RASF veränderten Bedingungen im Blutkreislauf nachahmen und zeigen, ob die RASF dadurch ihr Protein-Expressionsschema ändern. Diese veränderten Kulturbedingungen bieten keine Möglichkeit zur Adhäsion, einen höheren Serumgehalt und zusätzlich die Interaktion mit Thrombozyten.

#### 3.8.4.1. Vorbereitung der Thrombozyten

Die Konzentration der Thrombozyten im Thrombozyten-Konzentrat wurde mit Hilfe eines CELL-DYN Sapphire (Abbott, Baar, Schweiz) Zellzählgeräts bestimmt. Um eine Aggregation der Thrombozyten während der Lagerung zu verhindern, wurde das Konzentrat bei RT und einer Rotationsgeschwindigkeit von 150 x g auf einen Schüttler gelegt. Vor der Zentrifugation wurde das Thrombozyten-Konzentrat mit sterilem Natriumzitrat angesäuert, um eine Aktivierung der Thrombozyten während der Zentrifugation bei 1000 x g für 15 min bei RT zu verhindern. Die Thrombozyten wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^9$  Thrombozyten pro ml Medium resuspendiert.

#### 3.8.4.2. Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze

Die Ansätze aus Tabelle 30 wurden in sterile 250 ml Erlenmeyerkolben pipettiert, die speziell beschichtet sind und deshalb eine Adhäsion verhindern. Nach der 24 oder 48 stündigen Stimulation wurden die RASF entnommen und mittels des Zytospin-Verfahrens (siehe 3.4.) auf OT transferiert.

Tab. 30: Zusammensetzung Ansätze für die Kultur ohne Adhäsion

Nr.	FCS	Zeit	RASF	Thrombozyten	Menge
1	10%	24 Stunden	300000	-	20 ml
2	50%	24 Stunden	300000	-	20 ml
3	10%	24 Stunden	300000	5.000.000.000	20 ml
4	50%	24 Stunden	300000	5.000.000.000	20 ml
5	10%	48 Stunden	300000	-	20 ml
6	50%	48 Stunden	300000	-	20 ml
7	10%	48 Stunden	300000	5.000.000.000	20 ml
8	50%	48 Stunden	300000	5.000.000.000	20 ml
9	50%	24 und 48 Stunden	-	10.000.000.000	40 ml

### 3.8.4.3. Kultur ohne Adhäsion

Die Ansätze, die im Brutschrank bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> auf einem Rotationsschüttler bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 150 x g inkubiert wurden, unterschieden sich in der FCS-Konzentration, dem Vorhandensein von Thrombozyten und der Dauer der Inkubation (siehe Tabelle 30). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die RASF für spätere immunhistochemische Analysen mit der Zytospin-Zentrifuge (siehe 3.4.) auf OT übertragen, die für 10 min in -20 °C kaltem Aceton fixiert, getrocknet und bei -20 °C gelagert wurden.

### 3.8.5. RNase-Aktivitätstest

Die exRNase-Aktivität im Überstand der SF wurde bestimmt, indem 100 µl des Zellkulturüberstandes mit 50 µl RNase-Puffer und 100 µl einer *Polyinosinic-polycytidylic acid* (Poly (I:C))-Lösung (400 µg/ml) vermischt und 5 min bei 37 °C inkubiert wurden. Davon wurden 100 µl abgenommen und mit 250 µl eiskalter 6%iger Perchlorsäure mit 20 mM Lanthan(III)chlorid gemischt. Es folgte die Zugabe von 100 µl einer fettsäurefreien BSA-Lösung (10 mg / ml). Die Lösung wurde 15 min auf Eis inkubiert und dann weitere 15 min bei 4 °C mit 16000 x g zentrifugiert. Die Ermittlung der Aktivität der RNase erfolgte aus der Substratdegradation, indem die Absorption des Überstandes bei 280 nm photometrisch gemessen und auf den Proteingehalt des Zelllysates normiert wurde (25).

## 3.9. Statistik

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel. Die dargestellten Werte der experimentellen oder biologischen Replikate wurden als Mittelwert±SEM berechnet. Der SEM (Standardfehler des Mittelwertes) wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{SEM} = \text{STABW}(\text{Wert1}, \text{Wert2}, \dots) / \text{WURZEL}(\text{ANZAHL}(\text{Wert1}, \text{Wert2}, \dots))$$

Die statistische Beurteilung der Unterschiede erfolgte mit Hilfe des Studentischen t-Tests, als signifikant galten Werte mit  $p < 0,05$ .

---

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Zeitverlauf der Migration im SCID-Maus Modell

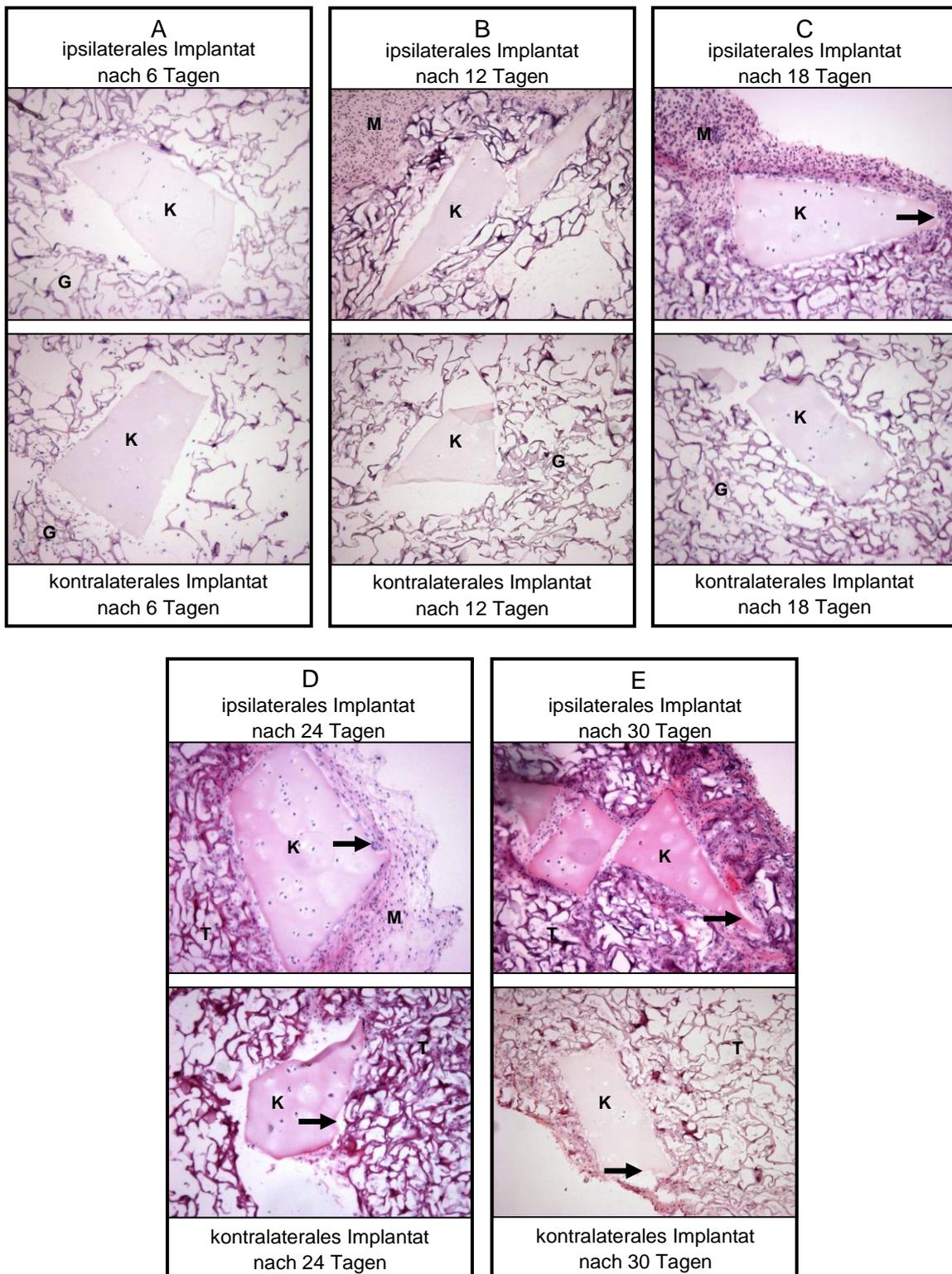
Der Ablauf der transendothelialen RASF-Migration *in vivo* sollte aufgrund seiner Komplexität anhand verschiedener Parameter untersucht werden. Diese Parameter beinhalteten das Adhärenzverhalten der RASF an den Knorpel sowie die Invasion in die Knorpelmatrix an der ipsi- und der kontralateralen Implantationsseite. Ein weiterer Punkt war die Untersuchung der RASF-vermittelten Induktion der Gefäßneubildung anhand der Auswertung von fotografischen Aufnahmen der Implantate mit umgebendem murinem Bindegewebe und einer immunhistochemischen Analyse der Implantate auf murines CD31. Zusätzlich wurde die Induktion der Gefäßneubildung durch RASF mit OASF verglichen.

#### 4.1.1. Zeitverlauf der RASF-Migration

Drei Experimente wurden mit dem SCID-Maus Modell durchgeführt, bei dem die Implantate jeweils zu definierten Zeitpunkten entnommen wurden wie unter 3.5.2. beschrieben. Zu dem jeweiligen Zeitpunkt wurden nicht nur die Implantate entnommen, sondern auch die Gefäßbildung an den Implantaten fotografisch dokumentiert und die humane DNS aus dem Blut der Tiere isoliert. Außerdem wurden aus dem Blut der Tiere aus Experiment 1 Zytospins (siehe 3.4.) des zellulären Anteils des Bluts angefertigt und immunhistochemisch analysiert.

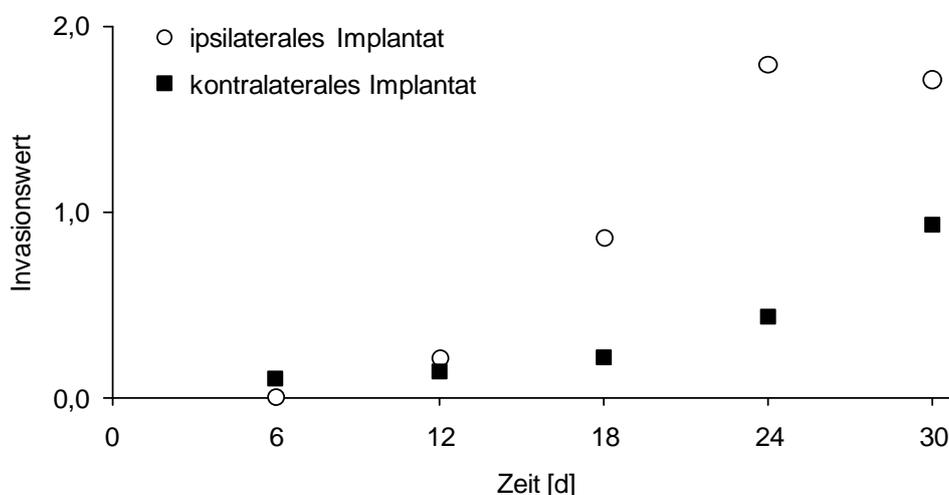
##### *Zeitverlauf der Invasion im SCID-Maus Modell, Experiment 1*

Die Analysezeitpunkte beim ersten Experiment lagen an Tag 6, 12, 18, 24 und 30 nach der Implantation. An Tag 6 waren auf beiden Implantationsseiten (ipsilateral mit, kontralateral ohne RASF) nur wenige Zellen im Implantat und keine in direkter Nachbarschaft zum Knorpel nachweisbar (siehe Abb. 14). Ab Tag 12 waren am ipsilateralen Implantat wenige, dicht am Knorpel liegende Zellen zu sehen. Der Knorpel befand sich auf einer Seite in direktem Kontakt mit dem umliegenden murinen Gewebe. An Tag 12 bis Tag 18 waren bei allen drei Versuchen die RASF in den ipsilateralen Implantaten direkt am Knorpel angelagert (siehe Abb. 14, Anhang Abb. 49 und 50). Auf der kontralateralen Seite waren die RASF etwas später (zwischen Tag 21 und Tag 24) am Knorpel zu erkennen (siehe Abb. 14, Anhang 49 und 50). Davor waren nur einzelne Zellen innerhalb der Gelatinematrix zu sehen.



**Abb. 14: Implantate des ersten SCID-Maus Versuchs zu verschiedenen Zeitpunkten.** Die Schnitte wurden mit H/E gefärbt wie unter 3.2.1. beschrieben. Dargestellt sind repräsentative Implantate, die die Zunahme der RASF-Invasion (➔) in den Knorpel wiedergeben. (A-E) Implantate von je einem Tier pro Zeitpunkt, jeweils oben das ipsilaterale und unten das kontralaterale Implantat in 100facher Vergrößerung. G = Gelatinematrix, K = humaner Knorpel, M = murine Haut.

Die Invasion des ipsilateralen Implantats (mit RASF implantierter Knorpel) nahm ab Tag 12 stetig bis zum stärksten gemessenen Invasionswert an Tag 24 zu (von 0,00 an Tag 6 bis 1,79 an Tag 24). Bereits nach 18 Tagen war im ipsilateral implantierten Knorpel ein Invasionswert von 0,86 messbar (siehe Abb. 15). An Tag 30 stieg die Invasion auf der ipsilateralen Seite nicht mehr an und wies einen Wert von 1,71 auf. Die Invasion des kontralateralen Knorpels (ohne RASF implantiert) begann erst ab Tag 24, und wies dort einen Invasionswert von 0,43 auf. An Tag 30 stieg der Invasionswert auf 0,93 an. Eine mögliche Plateau-Phase konnte beim kontralateralen Implantat durch den späten Beginn der Knorpelinvasion nicht nachgewiesen werden.

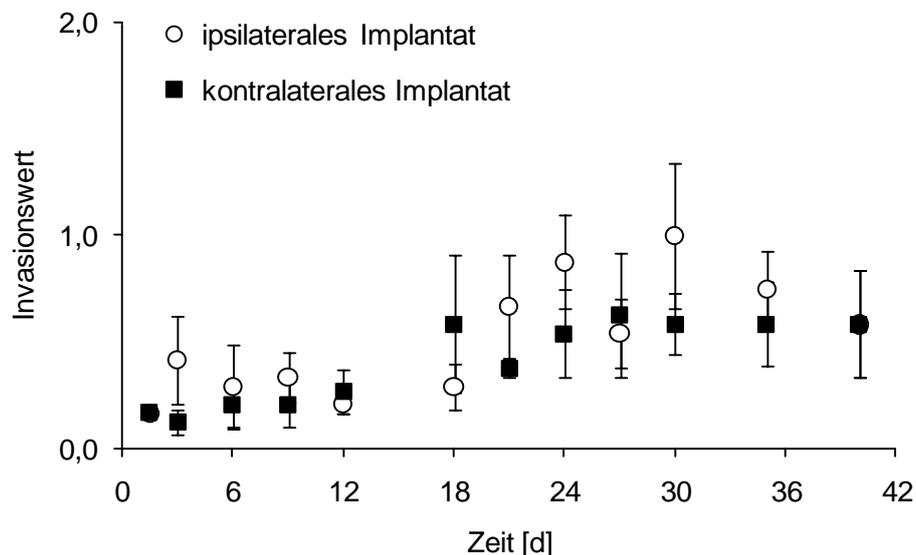


**Abb. 15: Invasion der RASF in den Knorpel des ersten SCID-Maus Versuchs zu verschiedenen Zeitpunkten.** Die Untersuchungszeitpunkte waren Tag 6, 12, 18, 24 und 30 nach der Operation. Es wurde 1 Tier pro Zeitpunkt analysiert. O: Wert der RASF-Invasion in den ipsilateralen Knorpel; ■: Wert der RASF-Invasion in den kontralateralen Knorpel. Die ipsilaterale RASF-Invasion war ab Tag 18 sichtbar, auf der kontralateralen Seite ab Tag 24. Die ipsilaterale Invasion war an Tag 24 am stärksten und an Tag 30 etwas geringer. Der kontralaterale sichtbare Invasionswert begann ab Tag 24 und stieg bis Tag 30 kontinuierlich an.

#### *Zeitverlauf der Invasion im SCID-Maus Modell, Experiment 2*

Der zweite Zeitversuch im SCID-Maus Modell wurde aufgrund der Ergebnisse des ersten Experiments engmaschiger und über eine Versuchsdauer von 40 Tagen durchgeführt (Analysezeitpunkte: Tag 1,5; 3; 6; 9; 12; 18; 21; 24; 27; 30; 35 und 40). Der Zeitverlauf wurde mit besonders vielen Zeitpunkten zu Beginn versehen und auf 40 Tage ausgedehnt, da in diesem Versuch vor allem die Gefäßneubildung, sowie die Anzahl der RASF im Blut pro Analysezeitpunkt, untersucht werden sollte. Da das Experiment zwölf Analysezeitpunkte beinhaltete, wurden, um den Aufwand der Operation nicht zu hoch werden zu lassen, nur zwei Tiere pro Zeitpunkt analysiert. Um die Anzahl der experimentellen Replikate zu

erhöhen, wurden bei diesem Experiment jedem Tier zwei Implantate pro Seite eingesetzt. Dabei wurden auf der ipsilateralen Seite zwei RASF-beinhaltende Implantate, wie unter 3.5.1. beschrieben, eingesetzt. Auf der kontralateralen Seite wurden zwei Implantate mit Knorpel aber ohne RASF in der Gelatinematrix eingesetzt. Beim zweiten Versuch des Zeitverlaufs war der Invasionswert im Vergleich zum ersten Experiment niedriger (siehe Abb. 16). Die ipsilaterale Invasion begann an Tag 18 und erreichte bis Tag 40 keinen Invasionswert über 1. Die kontralaterale Invasion begann an Tag 24 und erreichte bis Tag 40 keinen Invasionswert über 0,6. Allerdings waren sowohl bei den ipsi- als auch den kontralateralen Implantaten an den Tagen 1,5 und 3 nach der Operation sehr geringe Invasionswerte zu erkennen. Die ipsilaterale Invasion der RASF war meist stärker oder entsprach dem kontralateralen Invasionswert. Die Darstellungen der mit H/E gefärbten, repräsentativen Implantate erfolgt im Anhang unter Abb. 49.

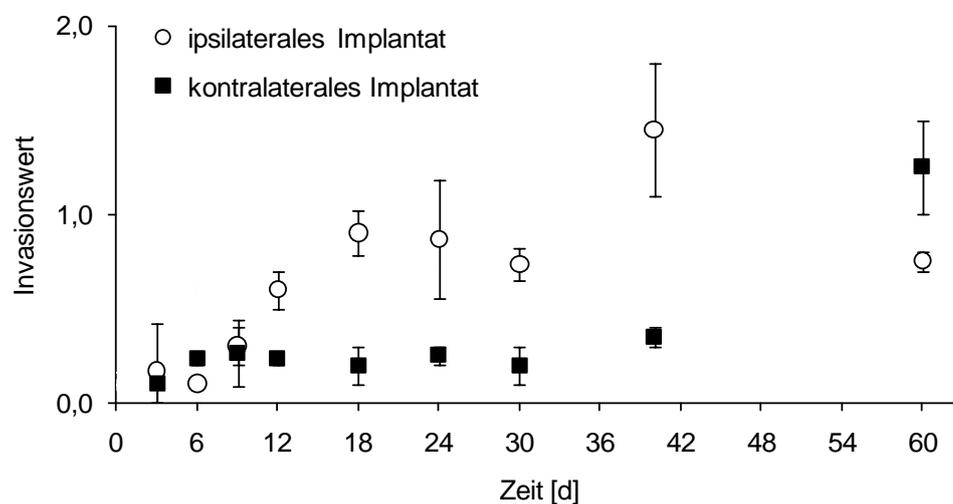


**Abb. 16: Invasion der RASF in die Knorpelmatrix über einen Zeitraum von 40 Tagen (Mittelwert±SEM).** Die Untersuchungszeitpunkte fanden an Tag 1,5; 3; 6; 9; 12; 18; 21; 24; 27; 30; 35 und 40 nach der Operation statt. Es wurden pro Zeitpunkt zwei Tiere mit zwei Implantaten pro Seite analysiert, an Tag 40 wurde ein Tier mit zwei Implantaten pro Seite ausgewertet. Die RASF-Invasion in den ipsilateral eingesetzten Knorpel war ab Tag 21 und auf der kontralateralen Seite ab Tag 27 sichtbar. Die ipsilaterale Invasion war an Tag 30 am stärksten und nahm an Tag 35 und 40 nicht mehr zu. Der kontralaterale Invasionswert war erst ab Tag 27 messbar. o: RASF-Invasion in den Knorpel des ipsilateralen Implantats; ■: Invasionswert der RASF auf der kontralateralen Seite.

### *Zeitverlauf der Invasion im SCID-Maus Modell, Experiment 3*

Das dritte Experiment zur Klärung des zeitlichen Migrationsablaufs enthielt längere Abstände zwischen den Analysezeitpunkten als Experiment 1 und dauerte bis Tag 60. Die Analysezeitpunkte waren nach 3; 6; 9; 12; 18; 24; 30; 40 und 60 Tagen. Diese Abstände wurden gewählt, da die Knorpelinvasion bei Experiment 2 deutlich schwächer war als bei

Experiment 1. Die sichtbare Invasion der RASF begann beim dritten Experiment auf der ipsilateralen Seite an Tag 12 mit einem Wert von  $0,60 \pm 0,10$  und kontralateral an Tag 40 mit einem Wert von  $0,35 \pm 0,05$ . Die kontralaterale Invasion erfolgte somit deutlich später als bei ersten Zeitversuch. Maximale Invasionswerte wurden auf der ipsilateralen Seite an Tag 40 mit  $1,45 \pm 0,35$  und auf der kontralateralen Seite an Tag 60 mit  $1,25 \pm 0,25$  erreicht (siehe Abb. 17). Auf der ipsilateralen Seite, bei der Knorpel und Fibroblasten koimplantiert wurden, war der Invasionswert meistens höher als auf der kontralateralen Seite, zu der die RASF erst migrieren mussten. Die Ausnahme stellte Tag 60 dar, an dem ein reduzierter Invasionswert der ipsilateralen Seite gegenüber Tag 40 zu beobachten war. Die Darstellungen der mit H/E gefärbten, repräsentativen Implantate erfolgt im Anhang unter Abb. 50.



**Abb. 17: Invasion der RASF in die Knorpelmatrix über einen Zeitraum von 60 Tagen (Mittelwert $\pm$ SEM).** Die Untersuchungszeitpunkte waren Tag 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 40 und 60 nach der Operation. Es wurden an Tag 3, 6, 9, 12, 18, 24, und 30, je 3 Tieren pro Zeitpunkt analysiert. An Tag 40 und Tag 60 waren es 2 Tiere pro Zeitpunkt. o: RASF-Invasion in den Knorpel des ipsilateralen Implantats; ■: Invasionswert der RASF auf der kontralateralen Seite. Die RASF-Invasion in den ipsilateralen Knorpel war ab Tag 18 sichtbar und auf der kontralateralen Seite ab Tag 40. Die ipsilaterale Invasion war an Tag 40 am stärksten und an Tag 60 etwas geringer. Der kontralaterale Invasionswert war erst ab dem vorletzten Zeitpunkt sichtbar und stieg bis Tag 60 drastisch an.

Die Invasion der RASF in den koimplantierten Knorpel auf der ipsilateralen Seite begann zeitgleich mit der Adhäsion der RASF an den Knorpel. Auf der kontralateralen Seite war nur beim dritten Experiment eine Zeitspanne von 16 Tagen zwischen der ersten Adhäsion an den Knorpel und dem Beginn der Invasion zu erkennen.

Zusammenfassend wurde in den drei durchgeführten Experimenten beobachtet, dass vor Tag 18 im ipsilateral implantierten Knorpel keine Invasion ersichtlich war. Die Invasion auf

der kontralateralen Seite war bei allen Experimenten erst zwischen Tag 30 und 40 nachweisbar, begann somit also frühestens 10 Tage später als auf der ipsilateralen Seite. Da jedes der Experimente einen anderen Endzeitpunkt hatte, kann nur Tag 30 als bei allen Experimenten analysierter später Zeitpunkt für den Vergleich der Invasivität der RASF-Populationen untereinander, gewählt werden. Aus den Abb. 15, 16 und 17 ist ersichtlich, dass verschiedene RASF-Populationen sehr unterschiedlich in ihrer Invasivität waren. Die RASF aus Experiment 1 waren am Invasivsten und die RASF-Population von Experiment 2 zeigte das schwächste Invasionsverhalten.

#### **4.1.2. Gefäßneubildung im SCID-Maus Modell**

Die fotografisch dokumentierten Implantate der SCID-Maus-Zeitversuche wurden auf sichtbare Gefäßneubildung hin untersucht und die Kryopräparate wurden immunhistochemisch mittels Färbung von CD31 analysiert. Außerdem erfolgte ein Vergleich der frühen RASF- oder OASF-bedingten Induktion einer Gefäßneubildung.

##### ***4.1.2.1. Fotografische Auswertung des Verlaufs der Gefäßneubildung***

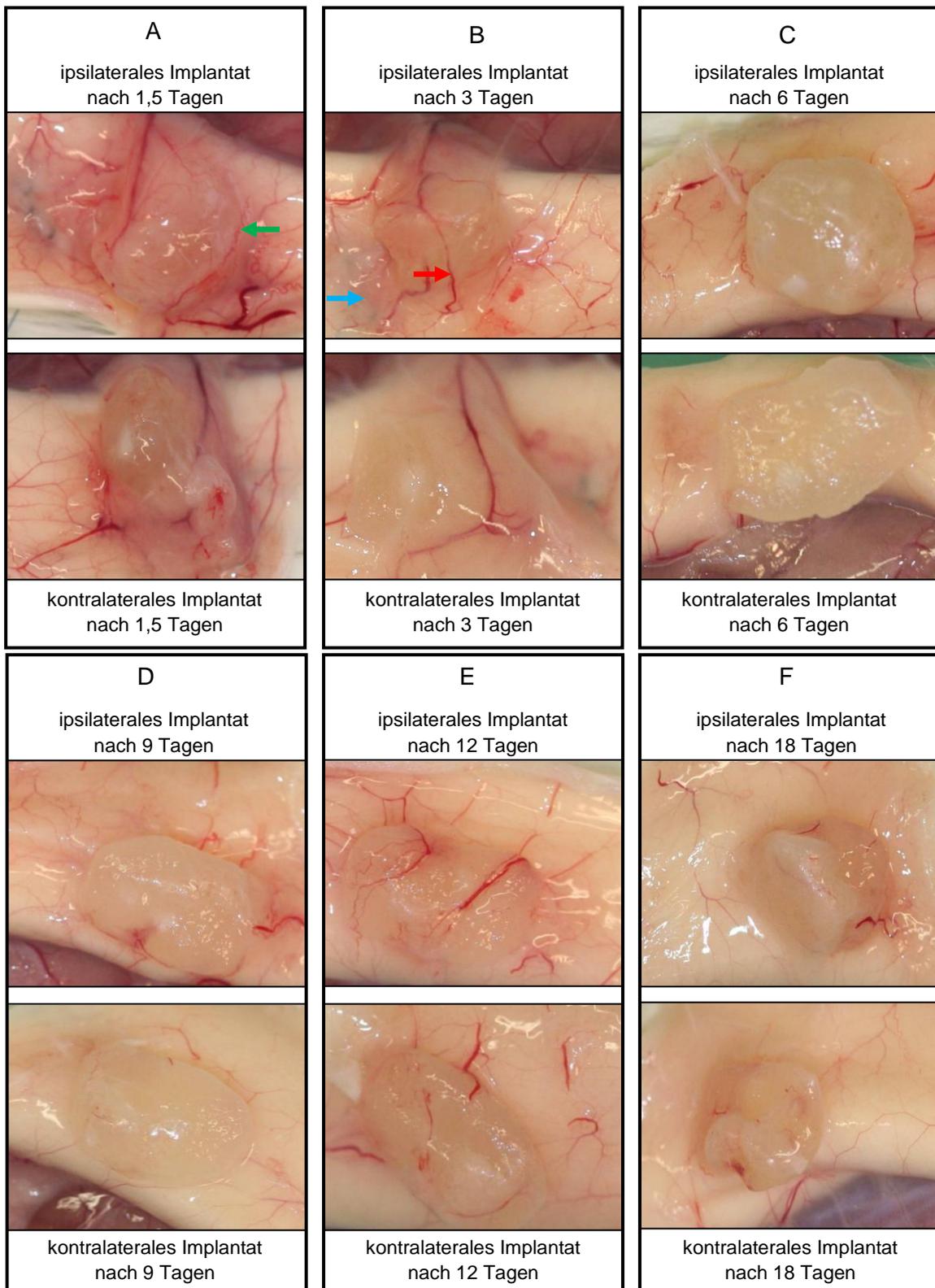
Die Vaskularisierung der drei SCID-Maus Experimente wurde fotografisch festgehalten, während das Implantat noch im Mausegewebe lag, um sowohl die Menge als auch die Art der neu gebildeten Gefäße zu beobachten. Die repräsentativen Bilder aus Abb. 18 sowie die Bilder im Anhang Abb. 51 und 52 zeigen den Verlauf der Gefäßneubildung an den Implantate im SCID-Maus Modell über einen Zeitraum von 30 bzw. 60 Tagen.

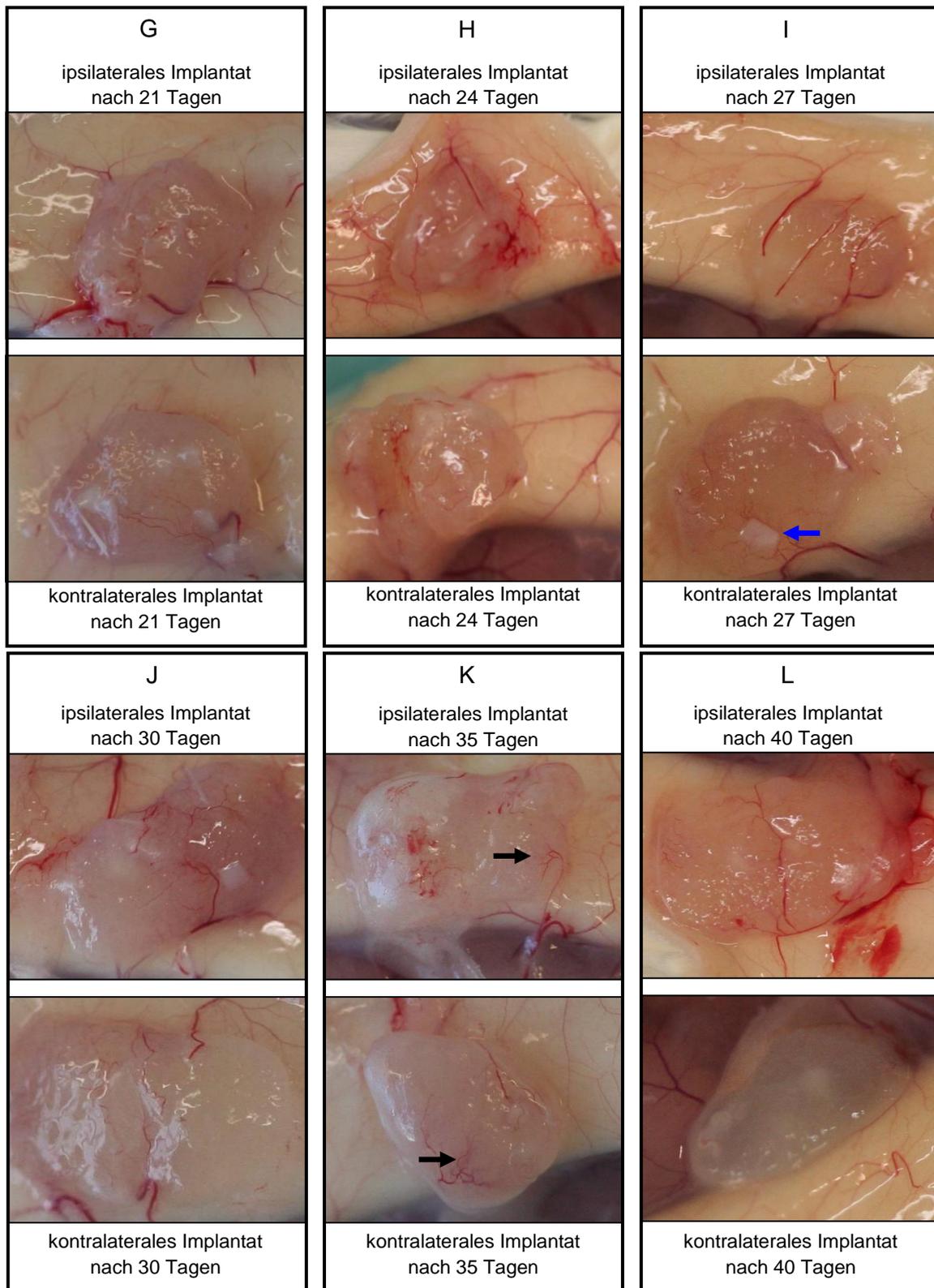
Die Vaskularisierung der Implantate begann bereits kurz nach der Implantation und lief in zwei Schüben ab. Die Bilder des zweiten (siehe Abb. 18) und des dritten Experiments (Anhang, Abb.51) zeigten eine deutliche und sehr frühe Gefäßneubildung außerhalb der Trägermatrix. Zuerst war eine sehr schnelle Induktion der Gefäßneubildung, bereits nach 1,5 Tagen, gut erkennbar, die am anliegenden murinen Gewebe, außerhalb des Implantats, stattfand. Diese erste Induktion hielt bei den unterschiedlichen Experimenten zwar unterschiedlich lange an, (Tag 30 beim ersten Experiment, Tag 3 beim zweiten Experiment und Tag 6 beim dritten Experiment) war jedoch in allen Experimenten vermehrt am ipsilateralen Implantat zu beobachten. An Tag 3 konnten im zweiten und im dritten Experiment viele Gefäße beobachtet werden, die klar vom Wundheilungsgewebe an der Narbe abgrenzbar waren. An Tag 6 und 9 waren in der zweiten Serie weniger Gefäße

sichtbar, in der dritten Serie erfolgte die Reduktion erst ab Tag 12. Da in der ersten Versuchsserie der erste Zeitpunkt nach 6 Tagen gewählt worden war, konnte für die erste Serie keine Aussage über die Gefäßneubildung an Tag 1,5 und 3 getroffen werden.

Die zweite Gefäßneubildung mit kleineren Gefäßen, die langsamer und im Inneren der Gelatinematrix zu beobachten war, begann bei allen Experimenten nach Tag 6 und nahm kontinuierlich bis Tag 60 zu. Interessanterweise war die Intensität der ersten und der zweiten Gefäßneubildung in den Implantaten von der eingesetzten RASF-Population abhängig.

Die Gefäßneubildung des ersten Zeitverlauf-Experiments (Anhang Abb. 51) mit sechs Analysezeitpunkten unterschied sich von den beiden späteren Experimenten. Beim ersten Zeitpunkt an Tag 6 war ersichtlich, dass im ipsilateralen Implantat wenige Gefäße außerhalb des Implantats verliefen. Am kontralateralen Implantat waren keine Gefäße zu erkennen. Nach 12 Tagen waren beide Implantate mit Gefäßen versorgt, die kontralaterale Seite schien jedoch besser durchblutet zu sein als die ipsilaterale. Dies lag an einer Einblutung in das kontralaterale Implantat während der Operation, die in einer verstärkten Angiogenese resultierte (2). Ab dem dritten Zeitpunkt (Tag 24) waren auf beiden Seiten deutlich die neu entstandenen Gefäße außerhalb und innerhalb der Gelatinematrix ersichtlich. Eine Abnahme der Gefäße außerhalb des Implantats und die Zunahme im Inneren waren beim ersten Versuch weniger deutlich. Interessant ist, dass bei allen drei Experimenten ein Unterschied zwischen der Gefäßneubildung der ipsilateralen und der kontralateralen Seite beobachtet wurde, der besonders zu Beginn deutlich ausgeprägt war.

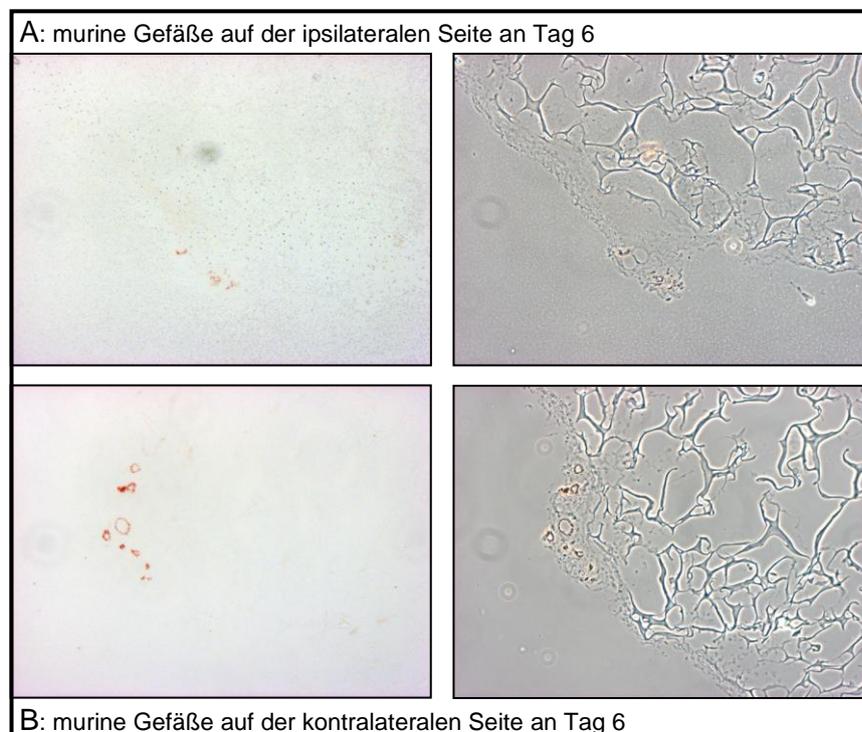




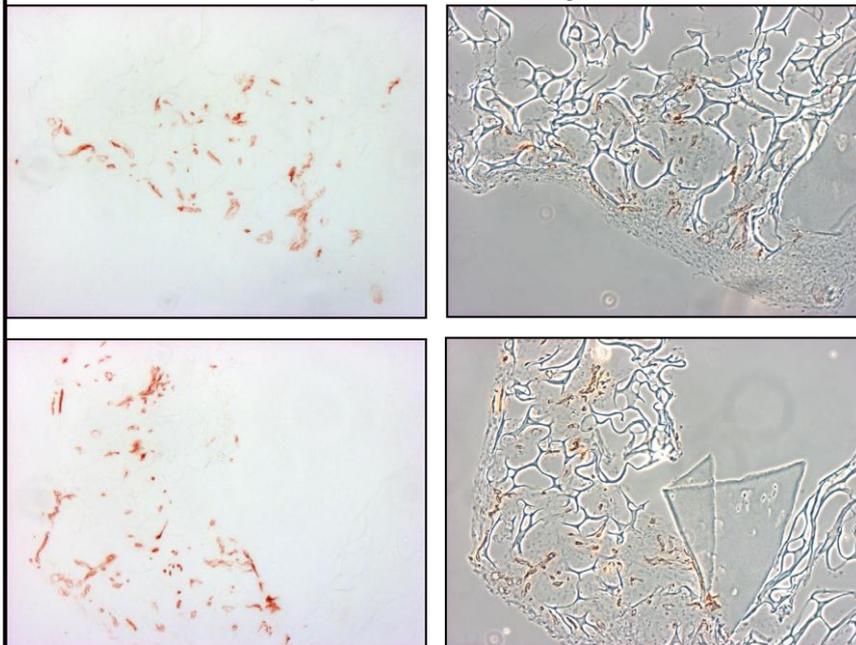
**Abb. 18: Gefäßneubildung an den Implantaten des SCID-Maus Versuchs zu verschiedenen Zeitpunkten.** (A-L): Implantate je eines Tieres (oben: ipsilateral; unten kontralateral) mit umliegendem murinen Gewebe. Deutliche Gefäßneubildung außerhalb der Trägermatrix ab Tag 1,5 nachweisbar (A), korkenzieherartiger Gefäßaufbau (←). (B): Tag 3: eine starke Durchblutung (→) ipsilateral, klar vom Wundheilungsgewebe der Narbe (→) abgrenzbar. Ab Tag 9 (D) sukzessive Zunahme der Vaskularisierung im Inneren der Gelatinematrix sichtbar. Unterschied zwischen ipsi- und kontralateraler Gefäßneubildung war zu jedem Zeitpunkt erkennbar (insbesondere Tag 1,5 und 3). (I): Tag 27 kontralateraler Knorpel von Gefäßen umgeben (←), (K): Tag 35: deutliche Gefäßbäume in beiden Implantaten erkennbar (→).

#### 4.1.2.2. Immunhistochemische Auswertung des Verlaufs der Gefäßneubildung

Mit Hilfe der immunhistochemischen Markierung der murinen Gefäße mit Antikörpern gegen murines CD 31 konnte, in einem 30 Tage dauernden SCID-Maus-Versuch, eine deutliche Zunahme der Vaskularisierung der Gelatinematrix während der Versuchsdauer bestätigt werden (siehe Abb. 19). Beim ersten Zeitpunkt, an Tag 6, ließen sich nur außerhalb der Gelatinematrix CD31-positive Zellen nachweisen. Beim zweiten Analysezeitpunkt, nach 12 Tagen, waren auf beiden Seiten CD31-positive murine Zellen in Knorpelnähe innerhalb der Gelatinematrix zu erkennen. An Tag 18 waren wieder CD31-positive Zellen in der Gelatinematrix auf der ipsilateralen Seite sichtbar. Auf der kontralateralen Seite hingegen waren nur außerhalb der Gelatinematrix CD31-positive Gefäße zu finden. An Tag 24 nach der Operation waren vereinzelte CD31-positive Zellen in beiden Implantaten zu sehen. Am letzten Analysezeitpunkt (Tag 30), war ein Netz aus murinen Gefäßen im ipsilateralen Implantat entstanden. Die Gefäße ließen teilweise ein Lumen erkennen. Die kontralaterale Seite hingegen wies kein durchstrukturiertes Gefäßnetz auf, sondern nur vereinzelte CD31-positive Zellen, vergleichbar mit Tag 24 (siehe Abb. 19 I).

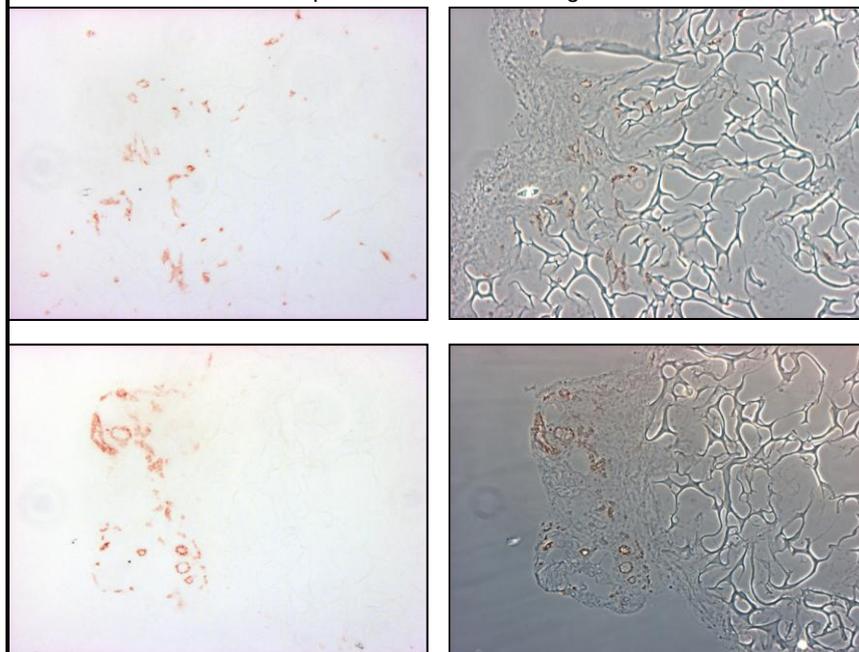


C: murine GefäÙe auf der ipsilateralen Seite an Tag 12

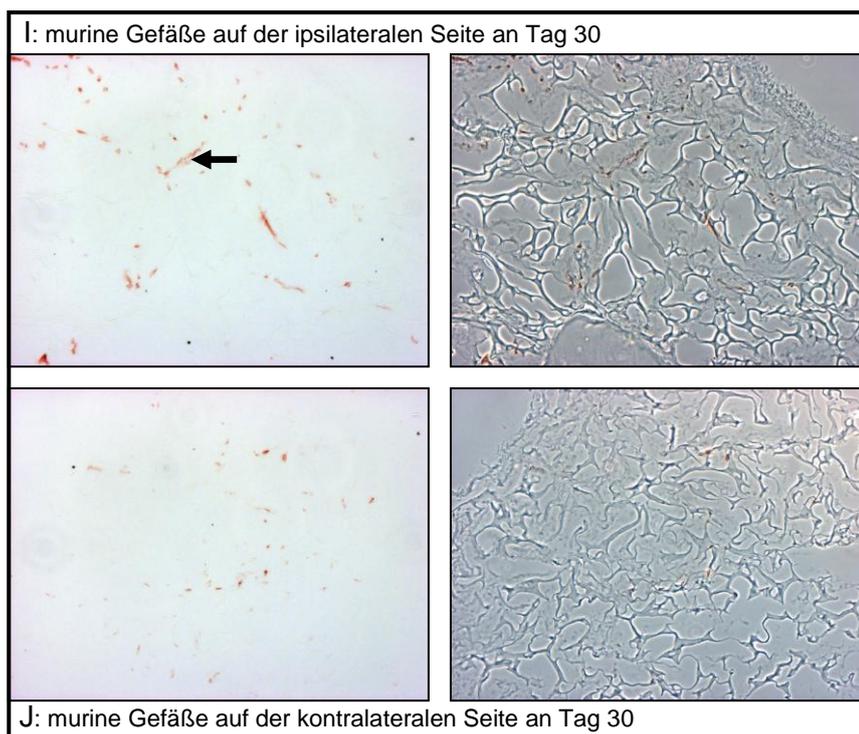
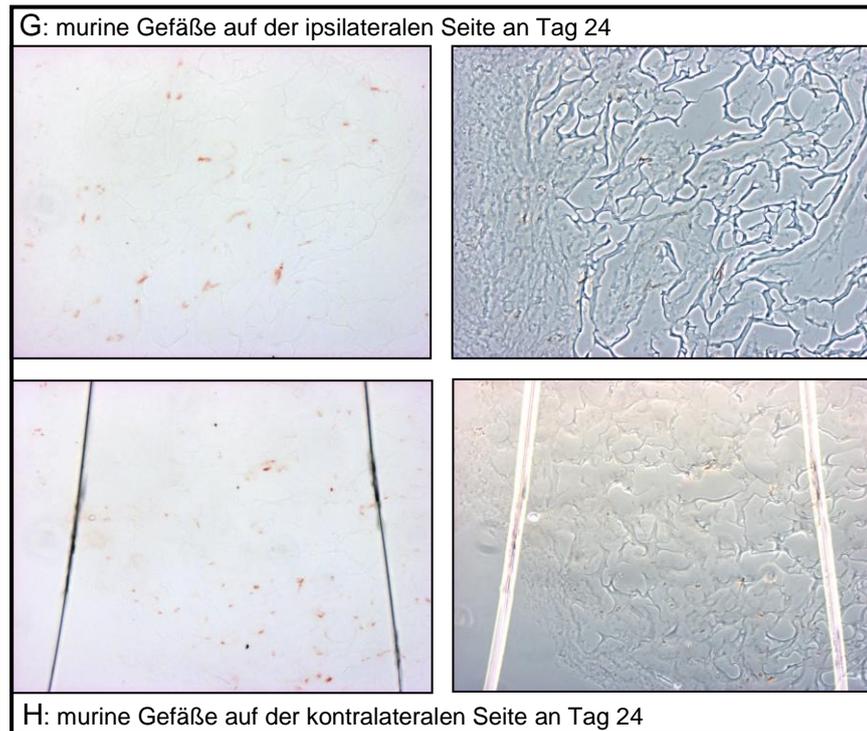


D: murine GefäÙe auf der kontralateralen Seite an Tag 12

E: murine GefäÙe auf der ipsilateralen Seite an Tag 18



F: murine GefäÙe auf der kontralateralen Seite an Tag 18



**Abb. 19: Immunhistochemischer Nachweis der Gefäßneubildung im murinen Implantat.** Verlauf der Angiogenese von Tag 6 über Tag 12, Tag 18, Tag 24 bis Tag 30. Färbung mit Antikörpern gegen murines CD31, wie unter 3.7.1. beschrieben. Aufnahme jedes Implantats im Durchlicht (links) und desselben Bereichs im Phasenkontrast (rechts). Implantate eines Tieres sind in einem Kasten dargestellt. Die oberen Bilder zeigen die ipsilateralen und die unteren die kontralateralen Implantate. Beginn der Einsprossung der Gefäße ab Tag 12 ipsi- und kontralateral. Zunahme der Komplexität der Gefäßstruktur über den Zeitverlauf. Ipsilateral ist ein Lumen im Gefäß in der Gelatinematrix zu erkennen (←).

---

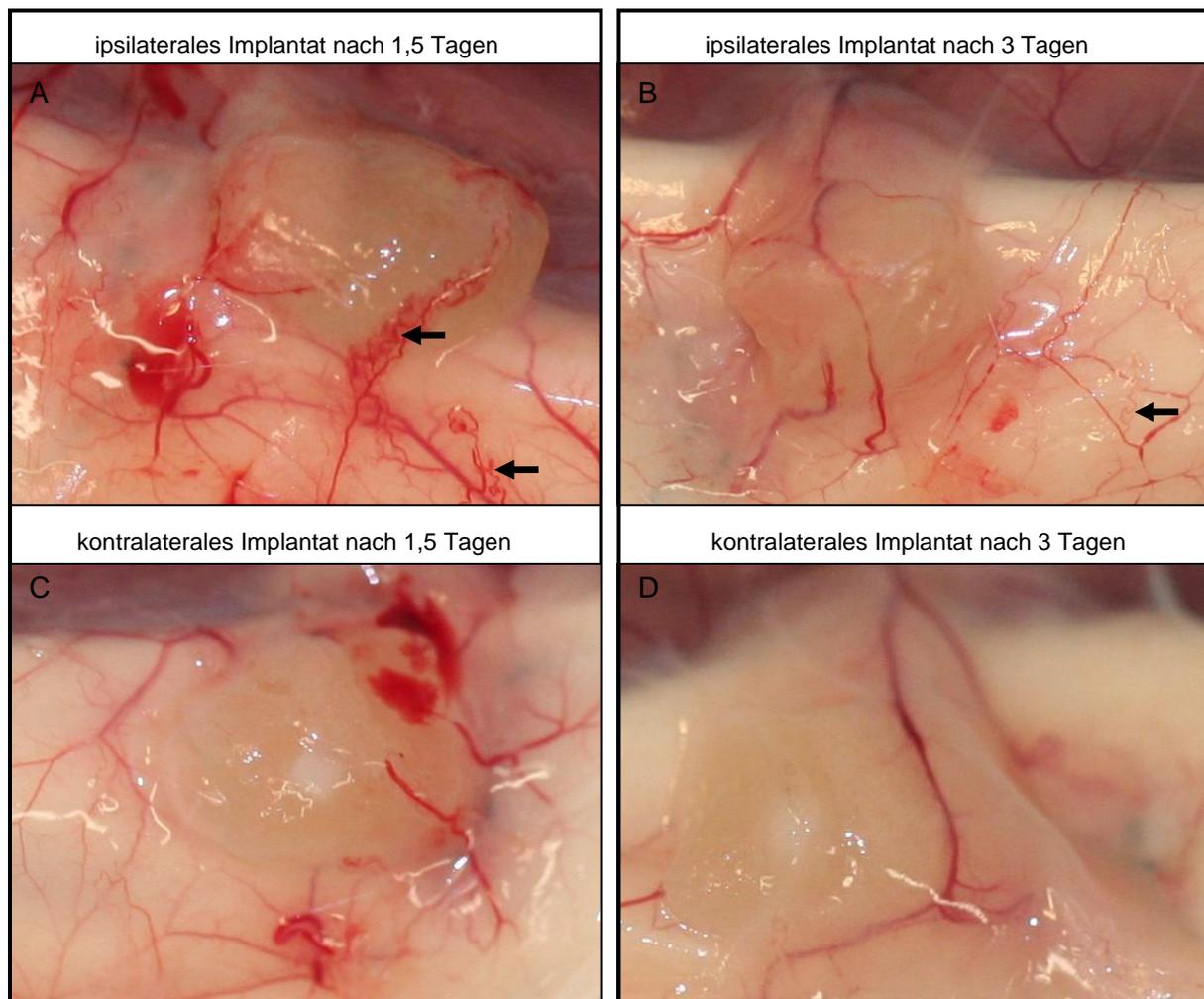
Die immunhistochemische Analyse der Gefäße bestätigte die fotografisch dokumentierte Gefäßneubildung an bzw. in die Implantate, die in Abschnitt 4.1.2.1. dargestellt ist.

#### **4.1.3. Gefäßneubildung durch RASF im Vergleich zu Kontrollfibroblasten**

In einem Tierversuch sollte geklärt werden, ob die Induktion der Gefäßneubildung nur für RASF typisch ist, oder ob SF von Patienten mit OA auch eine Vaskularisierung induzieren können. Da die deutlichen Unterschiede in der Gefäßneubildung zwischen ipsilateralem Implantat (mit RASF) und kontralateralem Implantat (ohne RASF) zu sehr frühen Zeitpunkten (1,5 und 3 Tagen) zu sehen waren, wurden diese Zeitpunkte für den Vergleich der RASF- bzw. OASF-induzierten Gefäßneubildung in SCID-Mäusen gewählt.

##### ***4.1.3.1. RASF-induzierte Gefäßneubildung***

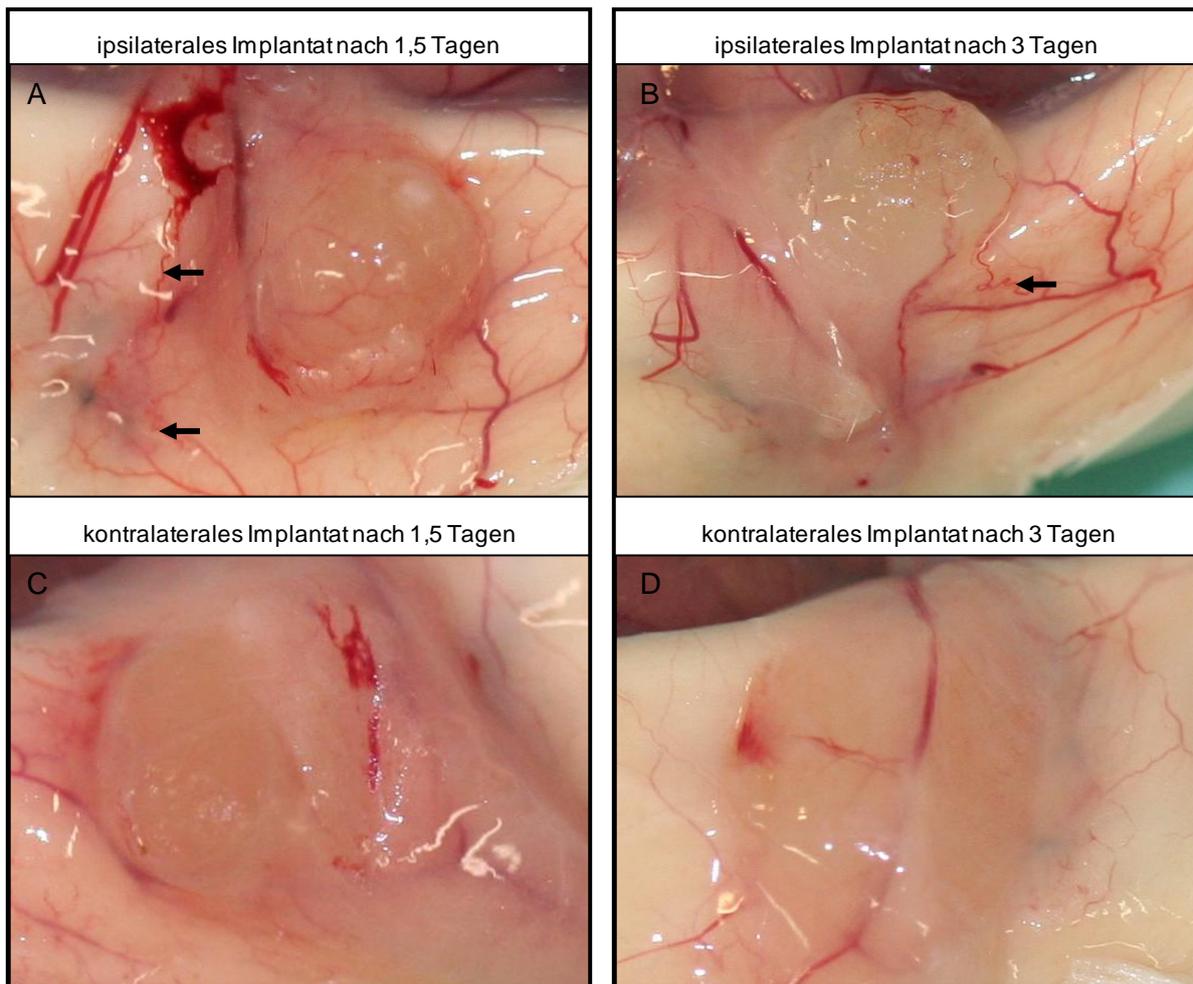
Die Operation der SCID-Mäuse verlief wie unter 3.5.1. beschrieben. Die Tiere erhielten RASF und humanen Knorpel in der Gelatinematrix auf der ipsilateralen Seite. Das kontralaterale Implantat enthielt humanen Knorpel in der Gelatinematrix, aber keine RASF. Wie schon unter 4.1.2.1. beschrieben, war die Gefäßneubildung um die Implantate herum nach 1,5 sowie 3 Tagen deutlich sichtbar und bestätigt sich in diesem Experiment. Am ipsilateralen Implantat war eine stärkere Gefäßneubildung zu beobachten als am kontralateralen Implantat (siehe Abb. 20). Außerdem fiel der korkenzieherartige Aufbau der Gefäße auf, der insbesondere an Tag 1,5, aber auch in geringerem Maße an Tag 3 zu beobachten war.



**Abb. 20: Neovaskularisierungsinduktion durch RASF nach 1,5 (A und C) und 3 Tagen (B und D) in der SCID-Maus.** Die ipsilateralen Implantate mit koimplantierten RASF (A und B) sind stärker vaskularisiert als die kontralateralen Implantate ohne RASF (C und D). An den ipsilateralen Implantaten (A und B) sind korkenzieherartige GefäÙe zu erkennen (←).

#### 4.1.3.2. OASF-induzierte GefäÙneubildung

Zum Vergleich wurden OASF zusammen mit humanem Knorpel in einer Gelatinematrix auf der ipsilateralen Seite implantiert. Das kontralaterale Implantat enthielt humanen Knorpel in der Gelatinematrix ohne OASF. Alle Implantate wiesen eine gut erkennbare Vaskularisierung auf (siehe Abb. 21), die auf der ipsilateralen Seite verstärkt war und teilweise ebenfalls wie in 4.1.3.1. einen korkenzieherartigen Aufbau aufwies.



**Abb. 21: Neovaskularisierungsinduktion durch OASF nach 1,5 (A und C) und 3 Tagen (B und D) in der SCID-Maus.** Die ipsilateralen Implantate mit koimplantierten OASF (A und B) sind stärker vaskularisiert als die kontralateralen Implantate ohne OASF (C und D). An den ipsilateralen Implantaten (A und B) sind korkenzieherartige Gefäße (←) zu erkennen.

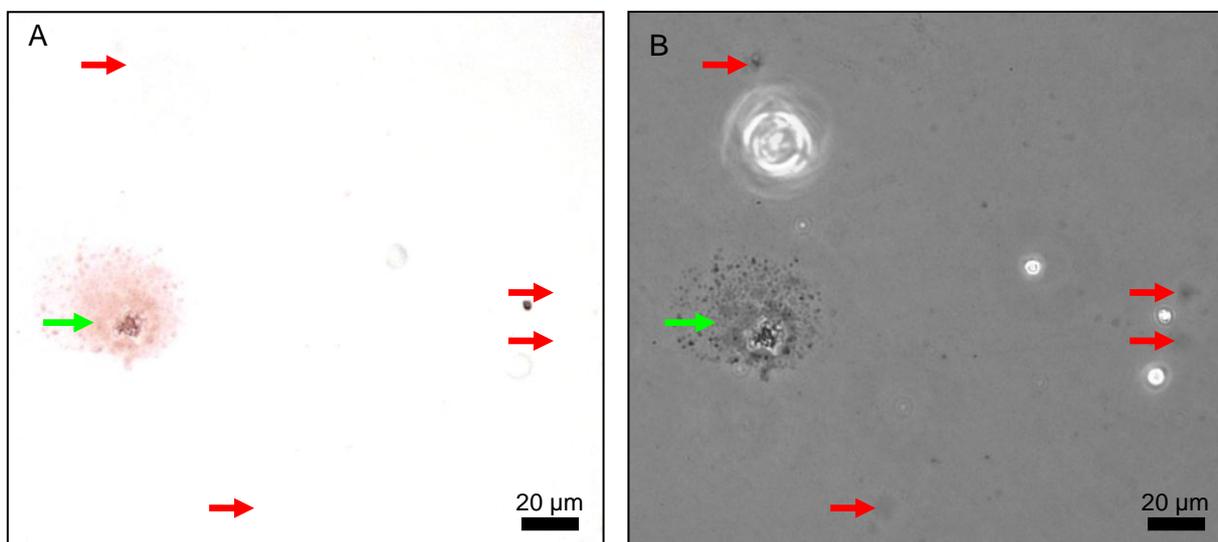
Beide RA- und OASF waren gleichermaßen in der Lage, die Gefäßneubildung zu verstärken. Die induzierte Gefäßneubildung nach 1,5 und 3 Tagen bei RA- und OASF unterschied sich nicht, es waren weder die Intensität noch die Struktur der gebildeten Gefäße verändert.

## 4.2. Analyse der RASF im murinen Blut

Der Aufenthalt der RASF im murinen Blut, sowie in den murinen Milzen, wurde immunzyto- und immunhistochemisch untersucht. Außerdem sollte die Konzentration humaner DNS im murinen Blut zu verschiedenen Zeitpunkten während des SCID-Maus-Versuchs analysiert werden.

#### 4.2.1. Nachweis von humanen RASF in murinem Blut

Der Nachweis von humanen RASF im murinen Blut der SCID-Mäuse erfolgte, anhand der immunzytochemischen Analyse der zellulären Bestandteile des Bluts, welche mit einem Zytospin auf einen Objektträger gebracht wurden (siehe 3.7.1. und 3.4.). Die humanen Fibroblasten ließen sich im murinen Blut mittels Spezies-spezifischer Antikörper nachweisen. Der Antikörper gegen humanes Follistatin erbrachte bei der Analyse der RASF im murinen Blut den deutlichen Nachweis der humanen RASF (siehe Abb. 22 A, grüner Pfeil). Die RASF sind eindeutig größer als die murinen Zellen und waren in geringerer Anzahl auf dem Objektträger zu finden. Die murinen Zellen waren nicht gefärbt und nur im Phasenkontrast sichtbar (siehe Abb. 22 B).

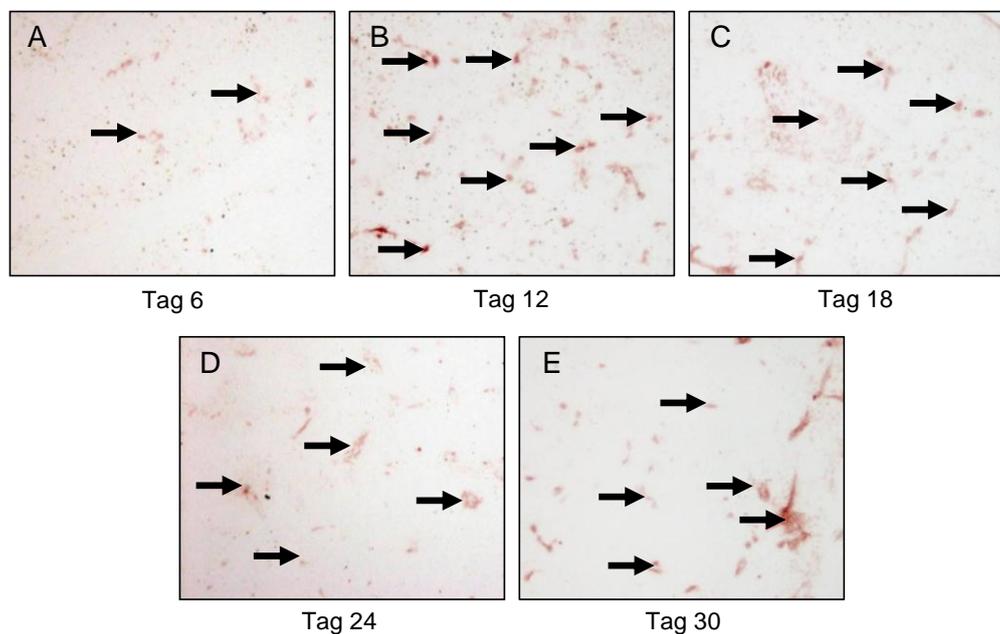


**Abb. 22: Nachweis humaner RASF in murinem Blut.** (A) Durchlichtaufnahme eines humanen RASF (→), der mit Antikörpern gegen humanes Follistatin angefärbt wurde. (B) Derselbe Ausschnitt im Phasenkontrast. Es sind sowohl der humane Fibroblast als auch murine Zellen (→) zu erkennen.

Die RASF im murinen Blut sind deutlich größer als die murinen Zellen und scheinen viele granuläre Strukturen zu enthalten, die auch nach dem Zytospin erkennbar sind. Die Zellmembran der humanen RASF wurde durch den Zytospin zerstört.

#### 4.2.2. Nachweis von humanen RASF in murinen Milzen

Da die Milz als immunologisches Organ eine Blutfilterfunktion, hat (109 und 63) und die humanen RASF größer sind als die murinen Blutzellen, wurden die murinen Milzen von SCID-Mäusen eines Zeitversuchs immunhistochemisch auf Signale von humanen RASF untersucht. Als Marker für die RASF wurde humanes Vimentin nachgewiesen, um eine möglicherweise zeitabhängige Anreicherung der humanen RASF in den murinen Milzen darstellen zu können. Aus Abb. 23 wird ersichtlich, dass humane RASF an jedem Zeitpunkt zwischen Tag 6 und Tag 30 in den murinen Milzen nachgewiesen werden konnten. An Tag 6 waren es weniger humane RASF als an den darauffolgenden Zeitpunkten.



**Abb. 23: Nachweis humaner RASF im murinen Milzgewebe.** (→): in den Milzen nachweisbare humane RASF. Färbung mittels anti-humanem Vimentin Antikörper. Ab Tag 6 nach der Operation bis Tag 30 waren die RASF nachweisbar.

Humane RASF transmigrierten sehr früh während des Zeitverlaufversuchs durch die Blutgefäßwand, bewegten sich mit dem Blutstrom, und blieben möglicherweise in den engen Kapillargefäßen der murinen Milz hängen, da sie schon an Tag 6 nach der Operation im Milzgewebe nachweisbar waren. Es konnte von Tag 6 zu Tag 12 eine Zunahme der Menge an RASF im Milzgewebe beobachtet werden. An den folgenden Zeitpunkten bis Tag 30 blieb die Menge der RASF in der murinen Milz in etwa konstant.

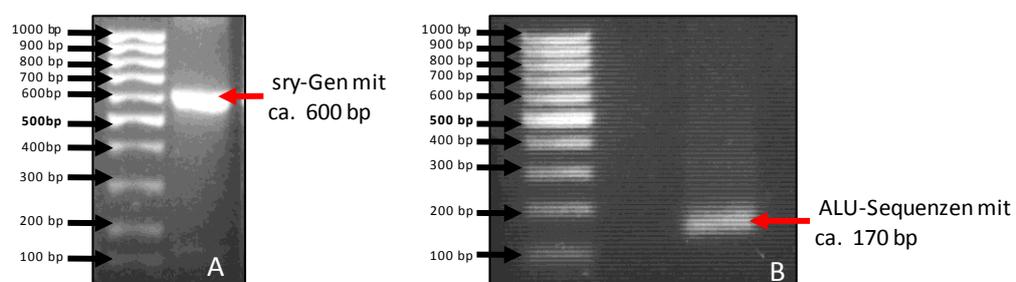
### 4.2.3. Untersuchung der humanen DNS im murinen Blut

Nachdem die humanen RASF im murinen Blut des ersten Zeitversuchs nachgewiesen werden konnten, sollte mittels einer PCR-Analyse die Menge der humanen Zellen an verschiedenen Zeitpunkten des 60 Tage dauernden SCID-Maus-Versuchs untersucht werden. Es sollten so Rückschlüsse auf die Anzahl der RASF im murinen Blut an verschiedenen Zeitpunkten gezogen werden. Dafür wurde die aus den zellulären Bestandteilen des murinen Bluts isolierte DNS (siehe 3.6.1.) auf das Vorhandensein von Human-spezifischen Gensequenzen hin untersucht.

Die erste Methode war der Nachweis des *sry*-Gens im Blut weiblicher Mäuse, die im SCID-Maus-Versuch die RASF eines männlichen Patienten erhalten hatten. Das *sry*-Gen ist ausschließlich auf dem Y-Chromosom der RASF des männlichen Patienten zu finden.

Es konnte nur in der Positivkontrolle eine Bande beobachtet werden (siehe Abb. 24 A). Für die Positivkontrolle wurde isolierte DNS, der männlichen RASF eingesetzt, die für den Mausversuch verwendet wurden.

Die zweite Methode beruhte auf der Amplifikation von humanspezifischen ALU-Sequenzen, die im murinen Genom nicht enthalten sind. Diese Methode wurde inzwischen für die RASF etabliert und derzeit wird die quantitative Auswertung der humanen DNS im murinen Blut durchgeführt. (siehe Abb. 24 B).



**Abb. 24: Banden der amplifizierten Positivkontrollen für das *sry*-Gen bzw. die ALU-Sequenzen.** (→): Basenpaarlänge der Markerbanden, (←): Banden der Positivkontrollen von: (A) *sry*-Gen und (B) ALU-Sequenzen.

Die PCR, die mit den spezifischen Oligonukleotiden für das *sry*-Gen und die ALU-Sequenzen durchgeführt wurde, zeigte deutliche Banden bei den Positivkontrollen. Die Amplifikation des *sry*-Gens gestaltete sich schwierig, denn obwohl ausreichend DNS aus dem murinen Blut isoliert werden konnte, scheint der humane Anteil an der Gesamt-DNS sehr gering zu sein. Auch das Mischen der DNS von zwei Tieren, denen das Blut am gleichen Analysezeitpunkt

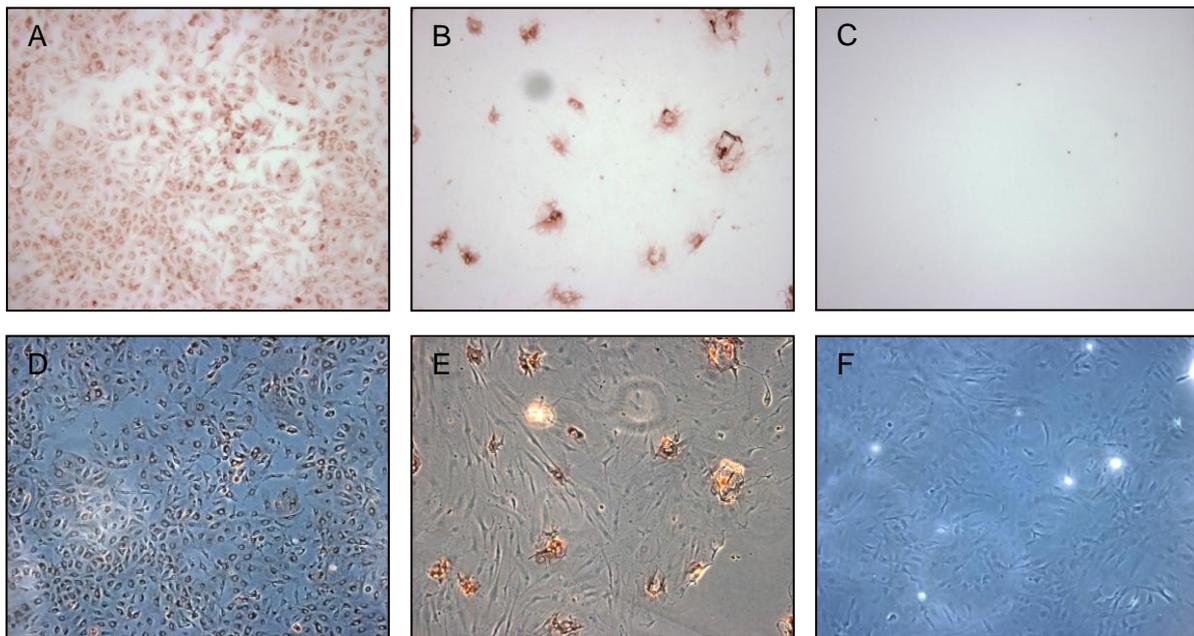
entnommen wurde, und die daraus resultierende Anreicherung, ließ nach der PCR bis jetzt keine Banden erkennen. Die Amplifikation der ALU-Sequenzen aus dem murinen Blut wird nach Anpassung der Parameter durchgeführt.

### **4.3. Adhäsions- und Transmigrations-Verhalten der RASF an Endothelzellen**

Die Interaktion der RASF mit den Adhäsionsmolekülen der EZ ist bei der Transmigration in die Gefäße sowie aus den Gefäßen heraus von fundamentaler Bedeutung. Daher wurden verschiedene funktionelle Analysen durchgeführt, um die zellulären Interaktionsprozesse von RASF mit EZ zu klären. Für die Testsysteme wurden teilweise selbstisolierte primäre EZ aus humanen Blutgefäßen verwendet (siehe Tabelle 7). Die primären EZ-Kulturen wurden vor ihrer Verwendung auf Verunreinigungen durch andere Zellen untersucht.

#### **4.3.1. Reinheit der primären humanen Endothelzellen**

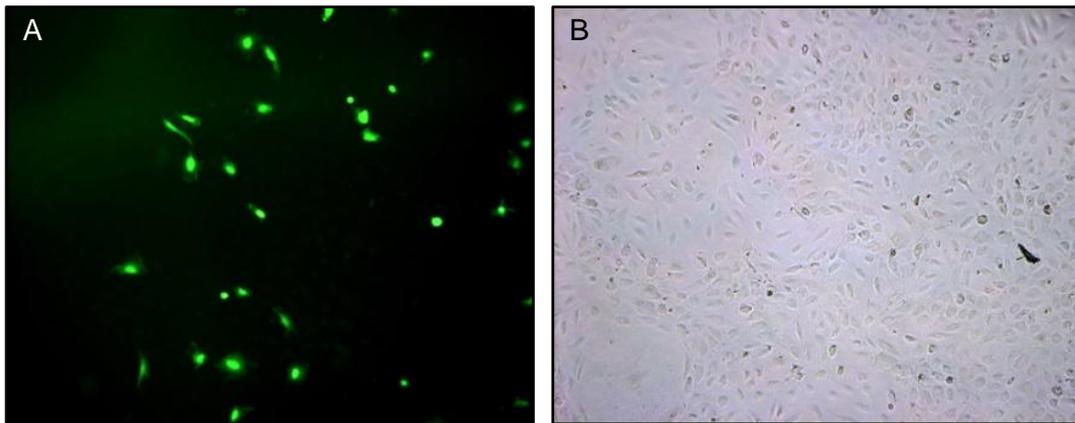
Die Reinheit der isolierten humanen EZ-Kulturen wurde immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen das humane Adhäsionsmolekül CD31 untersucht, wie unter 3.7.1. beschrieben. EZ-Kulturen, die keine Verunreinigung mit anderen Zelltypen enthielten, wiesen eine CD31 positive Färbung aller Zellen auf (siehe Abb. 25 A und D). Eine Mischkultur aus Endothelzellen und anderen Zelltypen (siehe Abb. 25 B), wies nur einige gefärbte Zellen auf, da sich nur die Endothelzellen anfärbten. Die ungefärbten Zellen waren nur im Phasenkontrast zu erkennen (siehe Abb. 25 E). Eine reine RASF-Kultur wies nach immunhistochemischer Färbung gegen CD31 kein Signal im Durchlicht auf, aber im Phasenkontrast waren die Zellen deutlich zu erkennen (siehe Abb. 25 C und F). Nur reine Endothelzellkulturen wurden für die folgend beschriebenen Versuche verwendet.



**Abb. 25: Unterschiedliche mit anti-humanen CD31-Antikörpern immunhistochemisch gefärbte primäre Zellkulturen.** A und D zeigen eine reine EZ-Kultur; B und E zeigen eine Mischkultur aus Endothelzellen und fibroblastoiden Zellen; C und F zeigen eine reine RASF-Kultur. A bis C: Aufnahmen im Durchlicht; D bis F: Aufnahmen im Phasenkontrast. Alle Aufnahmen in 100facher Vergrößerung.

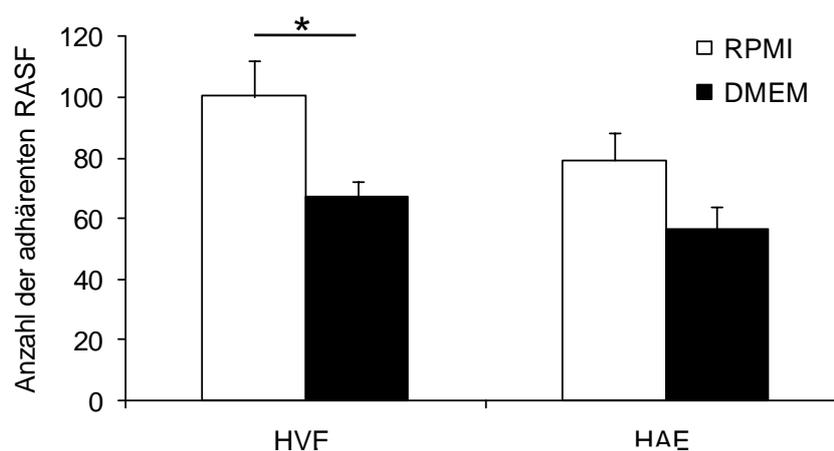
#### 4.3.2. Adhäsionsfähigkeit der RASF an verschiedene Endothelzellen

Dass RASF prinzipiell in der Lage sind, an EZ zu binden, wurde mittels Zell-Zell-Bindungsversuch nachgewiesen (siehe Abb. 26). Das Kulturmedium, sowie der Herkunftsort der EZ (arteriell, venös, kapillar), beeinflusst möglicherweise die Adhäsion der RASF an verschiedene EZ. Daher wurde analysiert, ob RASF an verschiedene EZ binden und ob kulturbedingte Unterschiede in der RASF-Adhäsion an EZ zu beobachten sind.



**Abb. 26: Auf EZ adhärierende RASF.** A: Calcein-AM gefärbte RASF im Fluoreszenzlicht; B: das selbe Gesichtsfeld im Phasenkontrast mit gut erkennbarer dichter EZ-Schicht.

Die stärkste Adhäsion konnte zwischen venösen EZ und RASF, die mit RPMI kultiviert worden waren, beobachtet werden ( $100,4 \pm 11,9$  adhärenente RASF/Gesichtsfeld). Die geringste Adhäsion war zwischen arteriellen EZ und RASF, die mit DMEM kultiviert worden waren ( $56,4 \pm 7,5$  adhärenente RASF/Gesichtsfeld) ersichtlich (siehe Abb. 27). Die Adhäsion von RASF an venöse EZ war insgesamt stärker als die Adhäsion von RASF an arterielle EZ (siehe Abb. 27). Der deutlichste sichtbare Effekt war die Abhängigkeit der RASF-Adhäsion vom verwendeten Medium; hierbei war die Adhäsion bei der Kultur der RASF in RPMI im Vergleich zur Adhäsion der in DMEM kultivierten RASF signifikant erhöht ( $p = 0,030$ ).



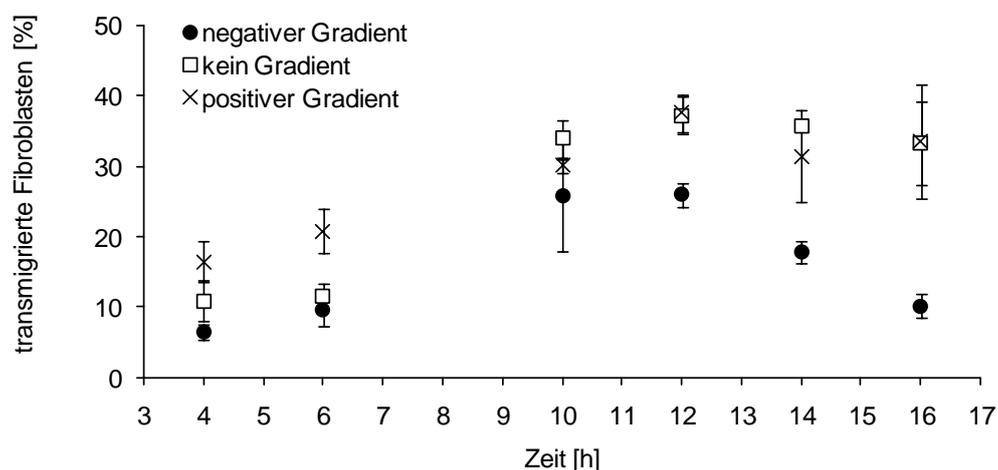
**Abb. 27: Vergleich der Anzahl adhärenenten RASF an humane venöse Endothelzellen (HVE) und humane arterielle Endothelzellen (HAE) nach der Kultivierung der RASF in RPMI (□) oder in DMEM (■) (Mittelwert±SEM).** Jeder Ansatz war mit experimentellen Triplikaten durchgeführt worden. Die Adhäsion der RASF an HVEs war signifikant erhöht nach einer Kultur in RPMI im Vergleich zur Kultur in DMEM. Die Adhäsion an HVE war stärker als die Adhäsion an HAE.

### 4.3.3. Analyse der RASF-Transmigration durch Endothelzellen *in vitro*

Im Transmigrationsassay sollte geklärt werden, ob RASF in der Lage sind, eine Schicht aus EZ, sowie eine poröse Membran mit 8 µm Porengröße zu überwinden (siehe Abb. 28). Dafür wurden RASF in die obere Kammer des *Transwells* auf eine EZ-Schicht aus HUVECs gegeben (siehe 3.8.1.1.). Nach 4, 6, 10, 12, 14 oder 16 Stunden Transmigrationszeit wurden die RASF in der unteren Kammer quantifiziert (siehe 3.8.1.2.). In der oberen Kammer jedes Ansatzes befand sich serumreduziertes Medium mit 2% FCS, in die unteren Kammern wurde Medium mit unterschiedlicher FCS-Konzentration gegeben. Ein FCS-Gradient mit einer höheren FCS-Konzentration in der unteren Kammer wirkt als Chemoattraktant für die RASF. Im Gegensatz dazu wirkte ein FCS-Gradient mit einer niedrigeren FCS-Konzentration in der unteren Kammer als Chemorepellent. Die Transmigrationsansätze für die Analyse der RASF-Transmigration *in vitro* sind in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31: Übersicht der Transmigrationsansätze

Name	RASF	FCS-Gehalt		
		obere Kammer		untere Kammer
negativer Gradient (●)	ja	2%	Repellent	0%
kein Gradient (□)	ja	2%	=	2%
positiver Gradient (x)	ja	2%	Attraktant	10%



**Abb. 28: Transmigration von RASF durch eine EZ-Schicht im Transmigrationsassay nach 4 bis 16 Stunden (Mittelwert±SEM).** Darstellung eines repräsentativen Experiments. Analysezeitpunkte 4, 6, 10, 12, 14 und 16 Stunden, je zwei experimentelle Replikate pro Ansatz und Zeitpunkt. Nach vier Stunden waren RASF in der unteren Kammer nachweisbar. Die Anzahl der migrierten RASF stieg in allen Ansätzen bis zum Zeitpunkt von zwölf Stunden an. Beim positiven Gradienten und Gradienten-freien Ansatz war nach zwölf Stunden eine Art Plateau-Phase zu erkennen, da die Anzahl der migrierten RASF in etwa gleich blieb. Beim negativen Gradienten nahm die Anzahl der RASF zwischen zwölf und sechzehn Stunden stark ab.

Von den  $1 \times 10^5$  RASF, die zum Zeitpunkt Null in die obere Kammer gegeben wurden, waren nach 4 Stunden  $6,50 \pm 0,99\%$  der Zellen bei dem Ansatz mit negativem Gradient,  $10,92 \pm 2,94\%$  beim Ansatz ohne Gradient und  $16,52 \pm 2,94\%$  beim Ansatz mit positivem Gradient in die untere Kammer migriert. Die Anzahl der transmigrierten RASF nahm in allen Ansätzen bis zu 12 Stunden kontinuierlich zu. Nach 12 Stunden waren in allen untersuchten Ansätzen die meisten RASF gewandert (negativer Gradient  $26,0 \pm 1,70\%$ ; kein Gradient  $37,3 \pm 2,69\%$ ; positiver Gradient  $37,6 \pm 2,66\%$ ). Danach konnte beim Ansatz mit positivem Gradient und dem Ansatz ohne Gradient eine Art Plateau-Phase beobachtet werden. Die Anzahl der transmigrierten Zellen stieg nicht mehr an (positiver Gradient 14 h =  $31,5 \pm 6,56\%$ ; 16 h =  $33,58 \pm 8,00\%$ ; kein Gradient 14 h =  $35,72 \pm 0,00\%$ ; 16 h =  $33,4 \pm 6,00\%$ ). Interessanterweise verringerte sich die Anzahl der transmigrierten Zellen nach 12 Stunden im Ansatz mit negativem Gradient (14 h:  $17,9 \pm 1,61\%$ ; 16 h:  $10,2 \pm 1,67\%$ ) wieder bis unter den Wert von 6 Stunden Transmigrationsdauer.

#### **4.4. Adhäsionsmoleküle in der Interaktion von RASF mit Endothelzellen**

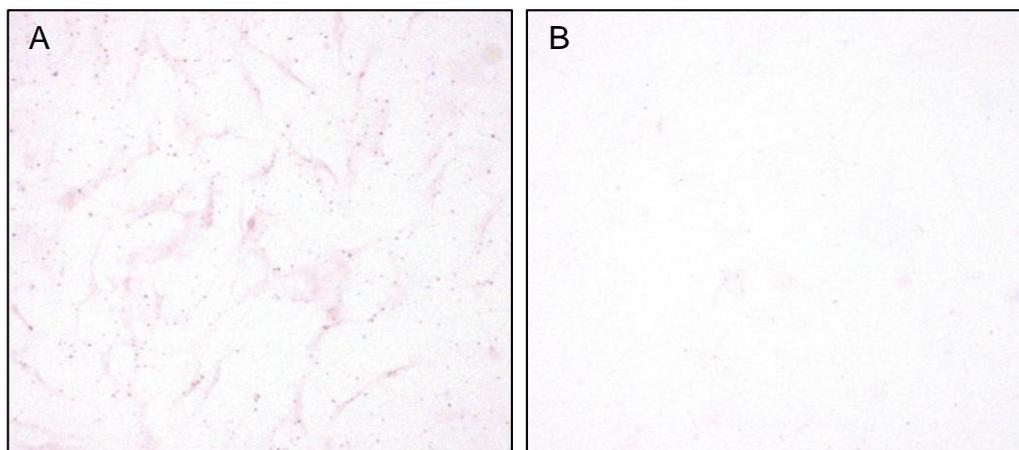
Die Expression des Adhäsionsmoleküls CD15s auf kultivierten RASF und im Synovialgewebe wurde immunzyto- und immunhistochemisch analysiert (siehe Abb. 29 und 30). Weiterhin wurde der Einfluss von E- und P-Selektin auf die Adhäsion von RASF an EZ *in vitro* in einem Flusskammer-System (siehe Abb. 32 und 33) untersucht. Die Wirkung der beiden Selektine auf die Transmigration der RASF wurde außerdem *in vivo* im SCID-Maus Modell analysiert (siehe Abb. 34 und 35).

##### **4.4.1. Expression von CD15s auf RASF**

Die Expression des Adhäsionsmoleküls Sialyl Lewis (CD15s), einem Bindungspartner des E-Selektins (10), wurde sowohl an adhärenenten als auch an nicht-adhärenenten RASF-Kulturen immunzytochemisch untersucht. Dies sollte klären, ob RASF CD15s im Blut bzw. Gewebe unterschiedlich exprimieren.

#### 4.4.1.1. Expression von CD15s auf RASF in Kultur mit Adhäsion

Die CD15s-Expression adhärenter RASF, die entweder mit RPMI oder mit DMEM kultiviert worden waren, wurde analysiert. Die Medien unterschieden sich im Grund-Medium, alle anderen Zusätze waren identisch (siehe Tabelle 10). Immunzytochemisch konnte humanes CD15s auf RASF nachgewiesen werden, die in RPMI kultiviert wurden. Im Gegensatz dazu war bei den RASF, die mit DMEM kultiviert worden waren, keine Expression von CD15s zu erkennen (siehe Abb. 29).



**Abb. 29: CD15s Expression auf der Oberfläche von adhärenter RASF.** (A) Die RASF wurden mit RPMI bzw. (B) mit DMEM kultiviert. In RPMI kultivierte RASF wiesen eine deutlich höhere Expression an CD15s auf.

Da sich die CD15s-Expression auf RASF bei unterschiedlichen Kulturbedingungen (DMEM und RPMI) unterschied, sollte untersucht werden, ob sich die Expression im Blutstrom verändert. Um die Bedingungen im Blut zu imitieren, wurde ein Schüttelversuch in Erlenmeyerkolben durchgeführt, an deren Wand Zellen nicht adhären können (siehe 3.8.4.).

#### 4.4.1.2. Expression von CD15s auf RASF in Kultur ohne Adhäsion

Die RASF, die ohne Adhäsion mit DMEM im Schüttelversuch kultiviert worden waren, wurden immunzytochemisch auf eine veränderte CD15s-Expression untersucht. Alle Färbungen mit anti-humanen CD15s-Antikörpern erbrachten kein Signal, vergleichbar mit Abb. 29 B. Weder die fehlende Adhäsion über 24 oder 48, Stunden, noch die Erhöhung der

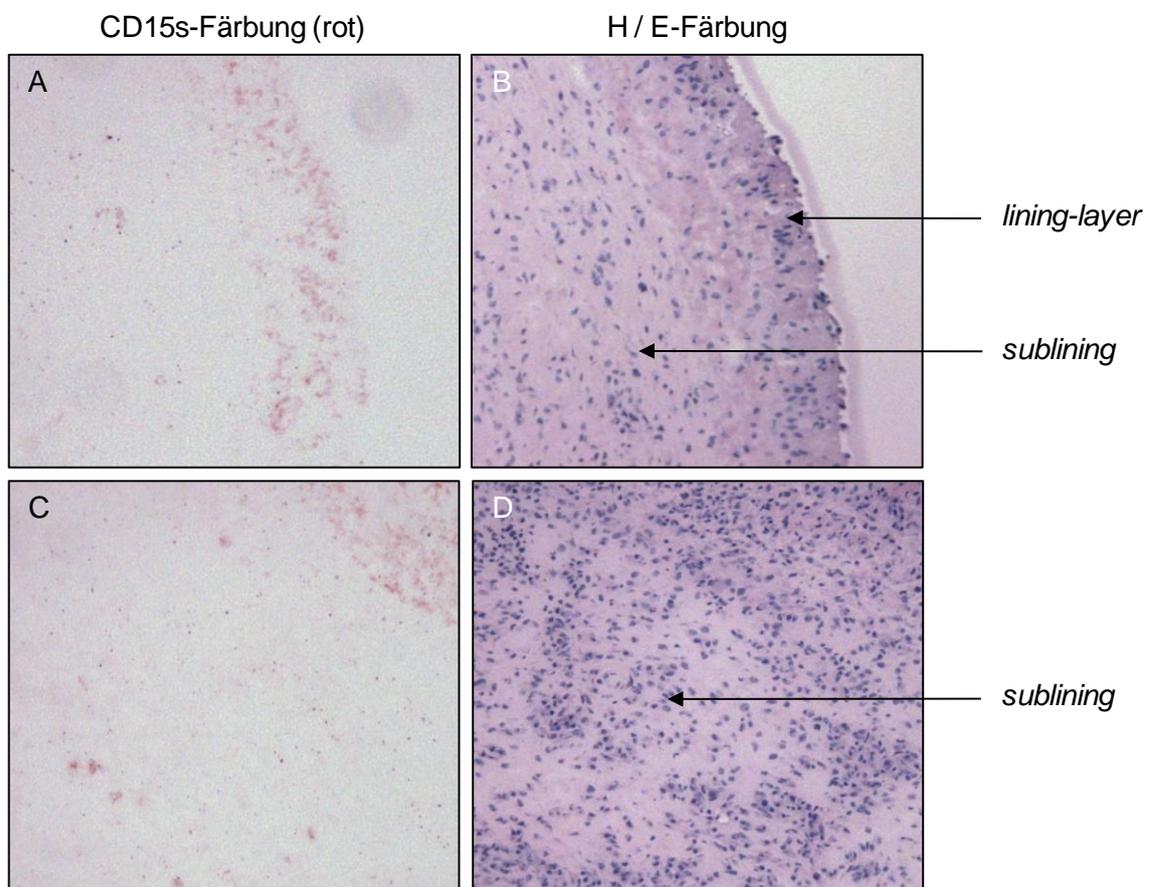
FCS-Konzentration von 10% auf 50%, noch die Zugabe von Thrombozyten hatten einen positiven Einfluss auf die Expression von CD15s. Der Schüttelversuch wurde bis jetzt nur mit DMEM durchgeführt, muss jedoch mit RPMI wiederholt werden.

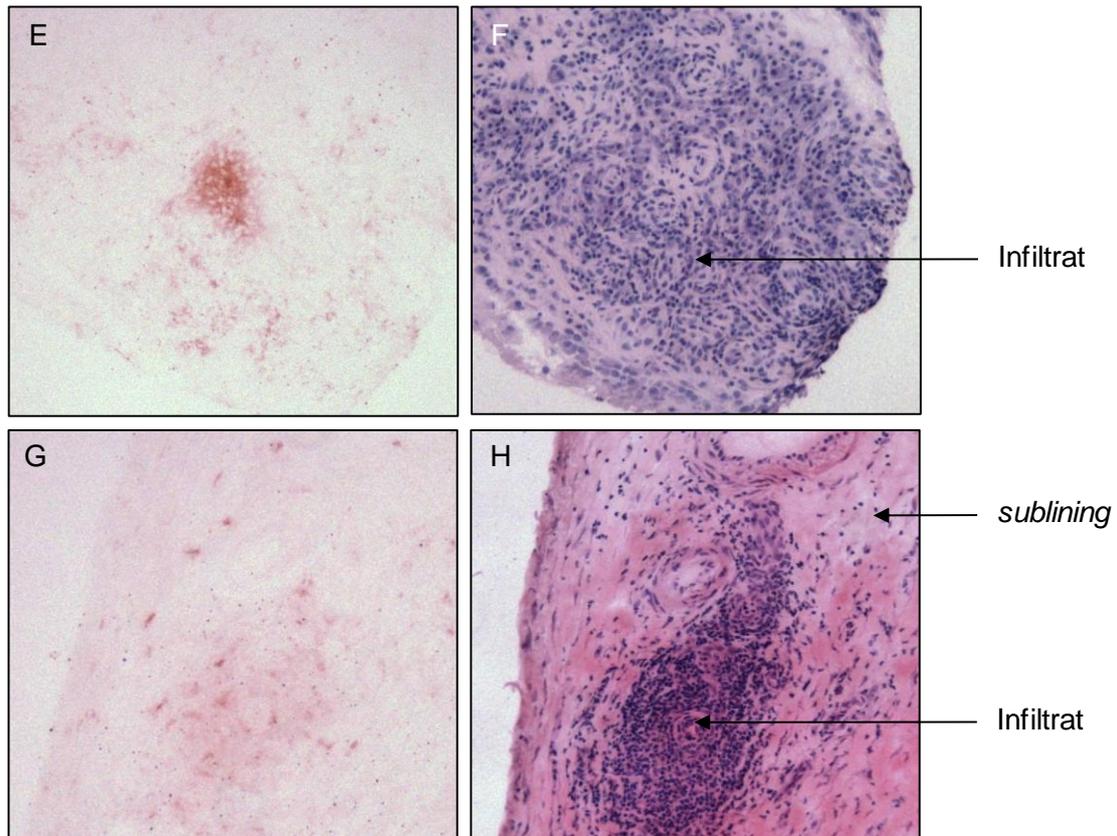
#### 4.4.1.3. Untersuchung zur Expression von CD15s im Synovialgewebe

Verschiedene kryokonservierte Synovialgewebe von Patienten mit RA wurden immunhistochemisch unter Verwendung von anti-humanen CD15s-Antikörpern untersucht, um zu testen ob CD15s im Synovialgewebe exprimiert wird, bzw. wo dieses lokalisiert ist.

Das CD15s-Signal konnte überall im Synovialgewebe verteilt an großen Zellen nachgewiesen werden. Das CD15s-Signal war im *lining layer*, (siehe Abb. 30 A und B), diffus verstreut im *sublining* (siehe Abb. 30 A, C und G) und in lymphatischen Infiltraten, (siehe Abb. 30 E und G) erkennbar.

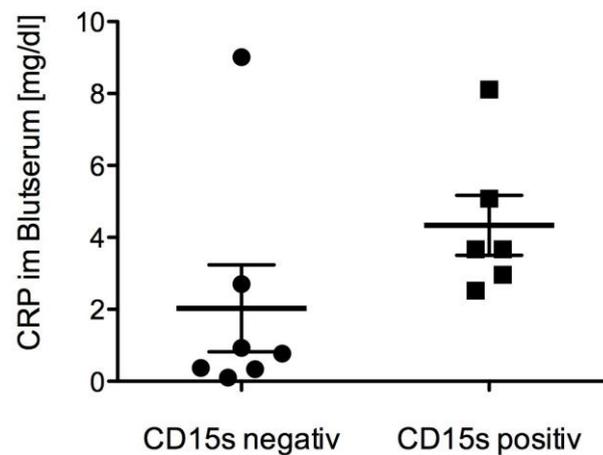
Jedoch wies nicht jeder analysierte RA-Patient ein positives CD15s-Signal in allen Bereichen des Synovialgewebes auf.





**Abb. 30: Nachweis von CD15s im Synovialgewebe von Patienten mit RA.** Dargestellt sind mit anti-CD15s Antikörpern immunhistochemisch analysierte Synovialgewebe von RA-Patienten und jeweils rechts davon die H/E-Färbung (serieller Schnitt). Die Lokalisierung wies ein CD15s-Signal im *lining layer* (A und C), diffus verstreut im *sublining* (C und G) und in Lymphozyten-Infiltraten (E und G) auf.

Ein positives CD15s-Signal konnte bei 53% der untersuchten RA-Gewebe nachgewiesen werden. Nach der Auswertung der Patientendaten stellte sich heraus, dass 75% der Patienten mit CD15s-Signal einen CRP-Wert im Serum von über 1,0 mg/dl aufwiesen. Von den anderen 25% lagen keine Informationen zum CRP-Wert im Serum vor. Nur 29% der CD15s-Signal-negativen Patienten hatten interessanterweise einen über 1,0 mg/dl erhöhten CRP-Gehalt im Serum, aber 71% lagen darunter. Die Berechnung des Korrelationsfaktors ergab einen Wert von  $r = 0,415$ . Bis jetzt wurde nur das Synovialgewebe eines OA-Patienten immunhistochemisch auf CD15s untersucht, dieses Gewebe zeigte kein Signal. Die Darstellung der Korrelation ist in Abb. 31 zu sehen. Die RA-Patienten mit CD15s-positiven Zellen im Synovium hatten einen durchschnittlichen CRP-Wert von  $4,33 \pm 0,83$  mg/dl und die RA-Patienten ohne CD15s-Signal hatten einen durchschnittlichen CRP-Wert von  $2,03 \pm 1,21$  mg/dl im Blutserum.



**Abb. 31: Korrelation des CD15s-Signals im Gewebe von RA-Patienten und dem CRP-Wert im Serum.** Der Balken zeigt den Mittelwert $\pm$ SEM. Die RA-Patienten mit CD15s-Signal im Synovialgewebe zeigen einen erhöhten Mittelwert des CRP-Werts im Serum im Vergleich zu RA-Patienten ohne CD15s-Signal. Von zwei untersuchten Patienten lagen keine Daten zum CRP-Gehalt in Serum vor, diese Gewebe wurden bei der Korrelation ausgeschlossen.

#### 4.4.2. Funktion von E- und P-Selektin bei der RASF-Transmigration

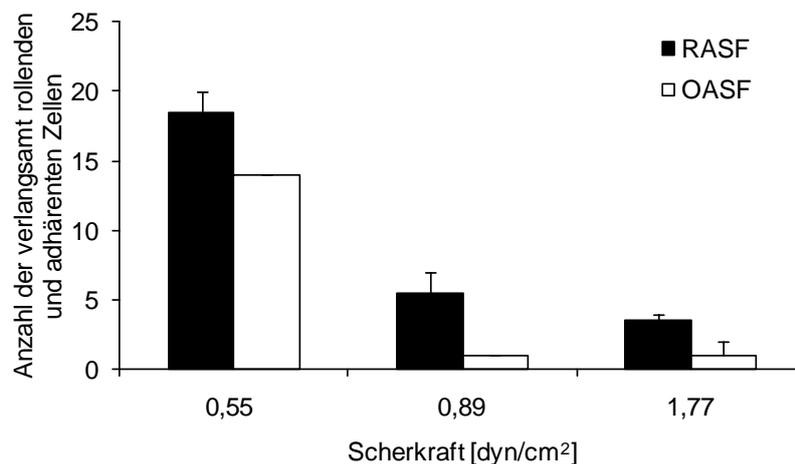
Die Beteiligung der Adhäsionsmoleküle E- und P-Selektin, die bei der Leukozyten-Adhäsionskaskade für die erste Phase, der Bindung ans Endothel, verantwortlich sind, sollte auch für die RASF-Transmigration *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

##### 4.4.2.1 Funktionsanalyse von E- und P-Selektin als Adhäsionsmolekül *in vitro*

Das Adhäsionsverhalten von RASF im Vergleich zu OASF an eine mit E- bzw. P-Selektin beschichtete Kapillare bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten und unterschiedlicher FCS-Konzentration im Flussmedium wurden in Flusskammerversuchen untersucht (siehe Abb. 3.8.3.). Die Kultivierung der SF mit DMEM und die Verwendung von DMEM im Flusskammerversuch ergab überraschenderweise, dass weder RA- noch OASF an die mit E- oder P-Selektin beschichteten Kapillarwände hafteten. Daher wurde anschließend RPMI als Kultur- und Fluss-Medium verwendet. Für die Kultur der Zellen wurde RPMI mit 10% FCS verwendet. Als Flussmedium diente RPMI sowohl mit 10% FCS als auch mit 50% FCS, was der Situation im Gefäßsystem eher entspricht. Es zeigte sich, dass mehr RASF in der Kapillare verlangsamt rollten oder adhärten als OASF. Dies war bei jeder untersuchten Scherkraft (0,55 bis 1,77 dyn/cm<sup>2</sup>) zu sehen (siehe Abb. 32).

Zum Vergleich: Die physiologischen Scherkräfte in den Arterien liegen bei ca. 100 dyn/cm<sup>2</sup>, bei Kapillaren bei ca. 50-12 dyn/cm<sup>2</sup> und bei Venen bei ca. 6 dyn/cm<sup>2</sup> (82).

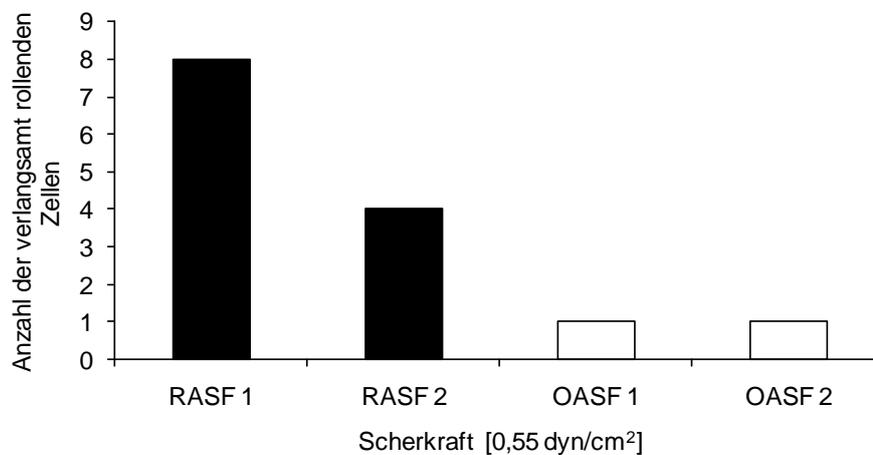
Durch eine Erhöhung der Scherkraft nahm die Gesamtanzahl an verlangsamt rollenden und adhärenen Zellen, sowohl bei den RASF als auch bei den OASF, ab (siehe Abb. 32). Bei 0,55 dyn/cm<sup>2</sup> adhärenen oder verlangsamteten sich an der Kapillare 18,5±1,5 RASF im Gegensatz zu 14,0±0,0 OASF. Bei einer Scherkraft von 0,89 dyn/cm<sup>2</sup> adhärenen 5,5±1,5 RASF oder rollten verlangsamt im Vergleich zu 1,0±0,0 OASF. Bei der höchsten Scherkraft von 1,77 dyn/cm<sup>2</sup> adhärenen dreimal so viele RASF oder rollten verlangsamt im Vergleich zu den OASF. Bei der Negativkontrolle, mit einer Kapillar-Beschichtung mit FCS, adhärenen weder RASF noch OASF an den Kapillaren. Auch bei P-Selektin-Beschichtung konnten weder verlangsamtete, noch stoppende Zellen im Sichtfeld der Kamera beobachtet werden.



**Abb. 32: Anzahl der verlangsamt rollenden und adhärenen Zellen (Mittelwert±SEM) auf einer mit E-Selektin beschichteten Oberfläche bei unterschiedlicher Scherkraft (Flussgeschwindigkeit).** Die FCS-Konzentration im Medium betrug 10%. Die RASF (■) zeigen eine vermehrte Adhäsion an E-Selektin als OASF (□) dies galt für jede gewählte Scherkraft. Messung mit zwei biologischen Replikaten.

Um den hohen Serumgehalt des Blutes im Flussmedium nachzuahmen, wurden die Flussversuche zusätzlich bei einer FCS-Konzentration von 50% im Flussmedium durchgeführt. Die dafür verwendeten SF wurden vorher mit RPMI mit 10% FCS kultiviert. Es rollten mehr RASF (8 und 4 Zellen; n = 2) als OASF (jeweils 1 Zelle; n = 2) verlangsamt über den mit E-Selektin beschichteten Kapillarboden (siehe Abb. 33). Nach einer Erhöhung der Scherkraft bei den Flusskammer-Versuchen mit 50% FCS im Flussmedium waren keine langsam rollenden oder adhärenen Zellen im Sichtfeld der Kamera mehr zu erkennen. In der Negativkontrolle, bei der die Kapillare mit FCS, beschichtet worden war und in der mit

P-Selektin beschichteten Kapillare, konnten bei 50% FCS im Flussmedium bei jeder untersuchten Scherkraft keine adhären oder rollenden SF beobachtet werden.



**Abb. 33: Anzahl der verlangsamt rollenden SF auf einer mit E-Selektin beschichteten Oberfläche bei 50% FCS.** Die Scherkraft betrug 55 dyn/cm<sup>2</sup> und die FCS-Konzentration im Medium 50%. Es rollten mehr RASF (■) als OASF (□) verlangsamt über den Kapillarboden.

Zusammenfassend konnte in den Flusskammerversuchen gezeigt werden, dass RASF *in vitro* nach der Kultur mit RPMI stärker an EZ und EZ-Adhäsionsmoleküle adhären als OASF. Dies trifft auch bei erhöhten FCS-Konzentrationen zu.

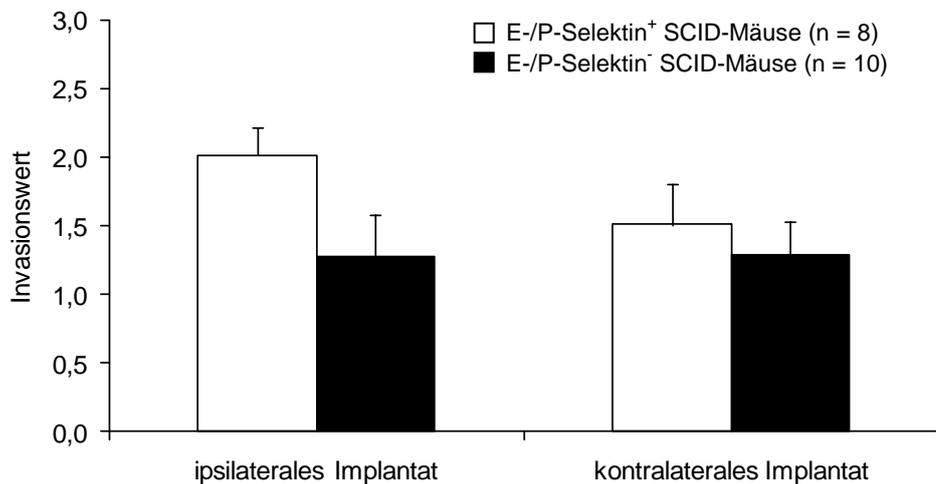
#### 4.4.2.2. Beteiligung von E- und P-Selektin an der Transmigration der RASF *in vivo*

Der Einfluss von E- und P-Selektin bei der Transmigration der RASF im SCID-Maus Modell wurde mit E- und P-Selektin-defizienten SCID-Mäusen im Vergleich zu SCID-Mäusen, die E- und P-Selektin normal exprimieren, untersucht (siehe Tabelle 6). Sowohl die E- und P-Selektin-defizienten SCID-Mäuse als auch die E- und P-Selektin normal exprimierenden SCID-Mäuse wurden, wie unter 3.5.4. beschrieben, am selben Tag und unter Verwendung der gleichen RASF-Populationen operiert.

##### *Experiment 1, Dauer 60 Tage*

Das erste Experiment zur Analyse der Beteiligung von E- und P-Selektin am Migrationsverhalten der RASF wurde über 60 Tage und mit zwei unterschiedlichen RASF-Populationen durchgeführt. Die Invasion der RASF nach 60 Tagen bei E- und P-Selektin-

defizienten Tieren war zwar nicht signifikant aber sichtbar geringer als bei den E- und P-Selektin normal exprimierenden SCID-Mäusen (E- und P-Selektin<sup>-</sup> SCID-Mäuse: ipsilateral =  $1,3 \pm 0,3$  und kontralateral =  $1,3 \pm 0,2$ ; E- und P-Selektin<sup>+</sup> SCID-Mäuse: ipsilateral =  $2,0 \pm 0,2$  und kontralateral =  $1,5 \pm 0,3$ ) (siehe Abb. 34).

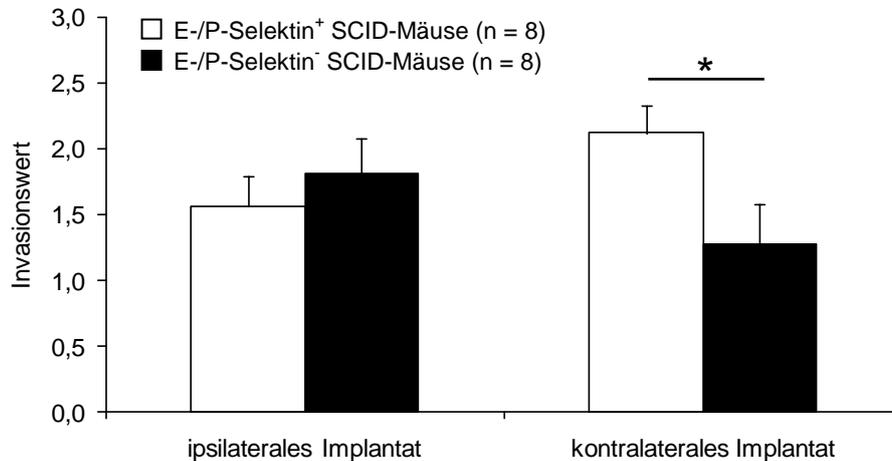


**Abb. 34: Vergleich der Invasion (Mittelwert $\pm$ SEM) zwischen E- und P-Selektin<sup>+</sup> SCID-Mäusen (□) und E- und P-Selektin<sup>-</sup> Tieren (■).** Sichtbare Reduktion der Invasion beim ipsilateralen Implantat, die keine Signifikanz erreichte und nur leichte Reduktion der Invasion kontralateral bei den E-/P-Selektin<sup>-</sup> SCID-Mäusen.

#### *Experiment 2, Dauer 45 Tage*

Die Ergebnisse des ersten Versuchs mit E-/P-Selektin-defizienten Mäusen wiesen nach 60 Tagen keine signifikant reduzierten Invasionswerte bei den Implantaten auf. Daher wurde der Versuch über einen kürzeren Zeitraum wiederholt, um einen zu späten Analysezeitpunkt auszuschließen, bei dem die Adhäsion der RASF an das Endothel durch andere Adhäsionsmoleküle (z.B. Integrine) kompensiert wurde. Die Versuchsdauer des zweiten Experiments wurde auf 45 Tage reduziert, außerdem wurde eine andere RASF-Population verwendet. Die Invasion auf der kontralateralen Seite war bei den E- und P-Selektin<sup>-</sup> SCID-Mäusen mit  $1,71 \pm 0,35$  im Vergleich zur Kontrollgruppe der E- und P-Selektin<sup>+</sup> SCID-Mäusen mit  $2,23 \pm 0,27$  signifikant reduziert (siehe Abb. 35) ( $p = 0,039$ ). Auf der ipsilateralen Seite war ein leichter Anstieg der Invasion von  $0,56 \pm 0,23$  bei der Kontrollgruppe mit normal exprimiertem E- und P-Selektin zur Gruppe mit den E- und P-Selektin<sup>-</sup>defizienten SCID-Mäusen ( $1,81 \pm 0,21$ ) zu beobachten. Die verwendete RASF-Population zeigte ein intensiveres Migrationsverhalten zur kontralateralen und dort ein stärkeres

Invasionsverhalten, im Vergleich zum ersten Experiment obwohl ein kürzerer Untersuchungszeitraum gewählt worden war.



**Abb. 35: Vergleich der Invasion (Mittelwert $\pm$ SEM) zwischen E- und P-Selektin<sup>+</sup> SCID-Mäusen (□) und E- und P-Selektin<sup>-</sup> SCID-Mäusen (■).** Leichte Erhöhung der Invasion auf der ipsilateralen Seite bei E-/P-Selektin<sup>-</sup> SCID-Mäusen. Signifikante Reduktion der Invasion beim kontralateralen Implantat ( $p = 0,039$ ).

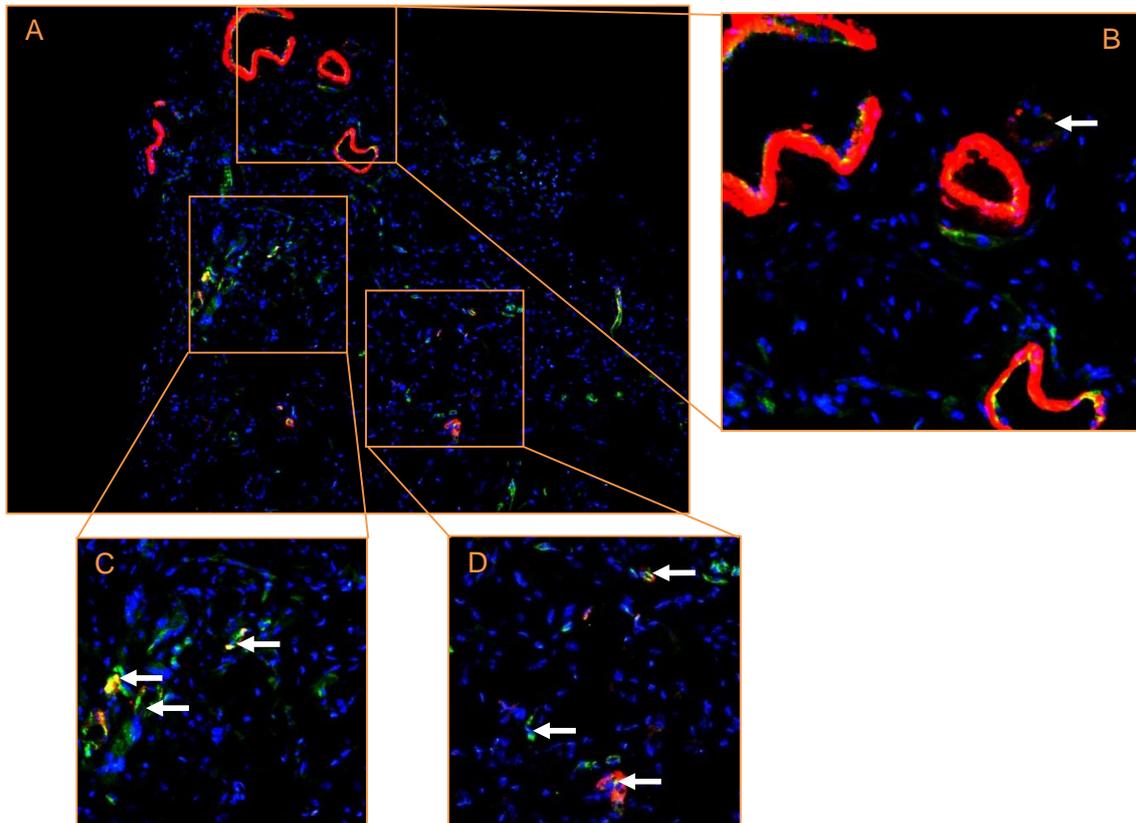
Beide Experimente *in vivo* zeigen, dass die E-/P-Selektin Defizienz der SCID-Mäuse das Migrations- und Invasionspotential der RASF beeinflusst, die Migration und Invasion jedoch nicht komplett gehemmt wird.

#### 4.4.3. Expression von CD31 und $\alpha$ -smooth muscle actin

Die Gefäßneubildung am und im Implantat wurden genauer untersucht, um die Art der Vaskularisierung zu charakterisieren, die wie unter 4.1.2. beschrieben in den Implantaten identifiziert wurde.

Anhand der Fluoreszenz-Aufnahmen wurde deutlich, dass 9 Tage nach der Operation der SCID-Mäuse außerhalb der Gelatinematrix große und zum Teil dickwandige Arteriolen zu erkennen sind. Diese besitzen einen gut sichtbaren äußeren Ring aus glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) und einen inneren Ring aus EZ. Außerdem konnte ein relativ großes Gefäß mit einem reduzierten  $\alpha$ -SMA-Signal beobachtet werden, das in seinem Bau an ein Kollateralgefäß erinnert, welches gerade durch einen arteriogenen Prozess umgebaut wird (siehe Abb. 36 B). Innerhalb der Gelatinematrix sind außerdem vereinzelte CD31-Signale zu erkennen, die teilweise daneben liegende  $\alpha$ -SMA-Signale aufweisen,

welche von SMC exprimiert werden (siehe Abb. 36 C und D). Das deutet darauf hin, dass nach 9 Tagen im Innern der Gelatinematrix sowohl vereinzelte EZ vorliegen, aber auch, dass schon mit SMCs umgebene Gefäße gebildet wurden.



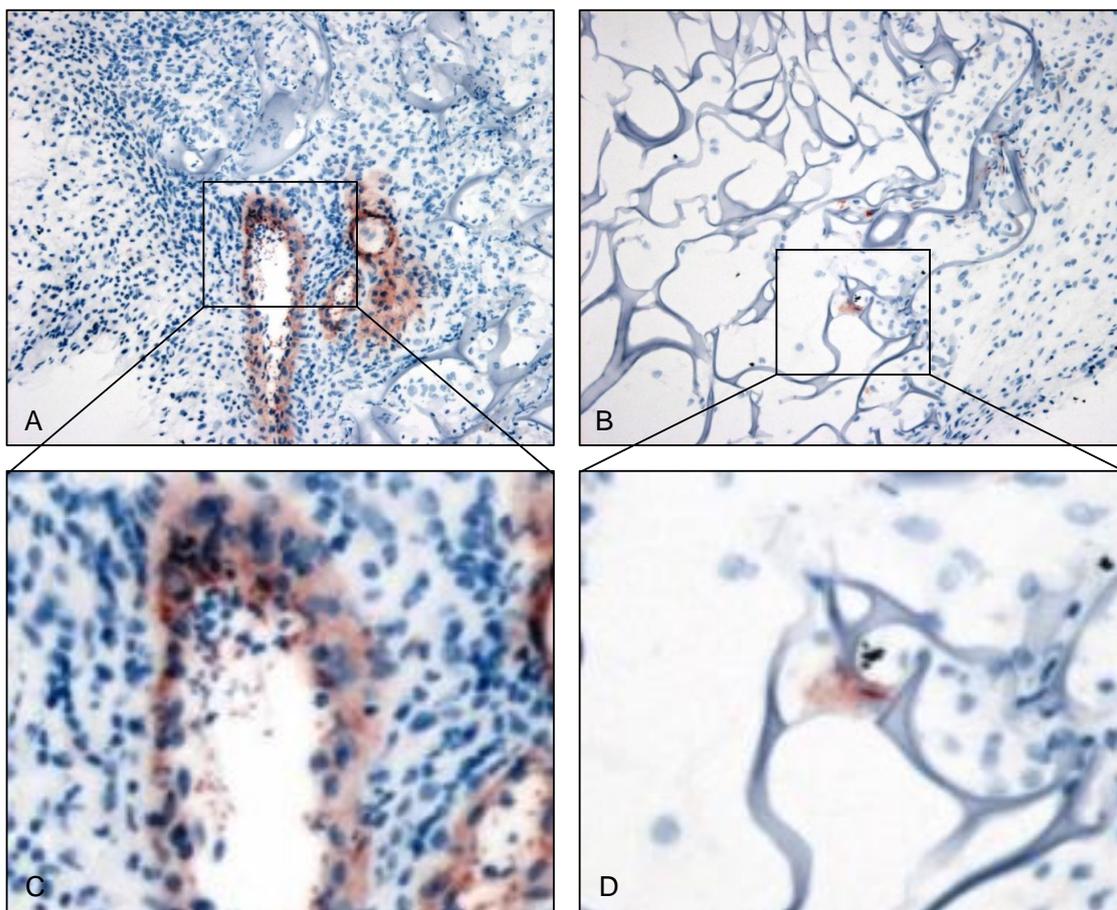
**Abb. 36: Doppelfluoreszenzmarkierung der ipsi- und kontralateralen Implantate gegen murines CD31 (■) und murines  $\alpha$ -SMA (■).** Beispiel eines ipsilateralen Implantats, das 9 Tage nach der Operation entnommen wurde. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (■). Die Überlagerung des roten und des grünen Signals resultiert in einer gelben Färbung. (A) Übersichtsbild; (B) Außerhalb der Gelatinematrix sind Gefäße mit deutlichem  $\alpha$ -SMA- sowie CD31-Signal, aber auch einzelne CD31-Signale zu erkennen. Der weiße Pfeil deutet auf ein Blutgefäß mit schwachem  $\alpha$ -SMA-Signal hin. (C und D) Die weißen Pfeile markieren einzelne CD31 Signale, die in der Gelatinematrix lokalisiert sind. Außerdem sind Regionen mit  $\alpha$ -SMA-Signal mit im inneren des Rings vorliegenden murinem CD31 markiert.

#### 4.5. Bindung von RASF an Thrombozyten

Durch die Arbeiten anderer Arbeitsgruppen war bekannt, dass die Interaktion der Leukozyten bzw. EZ mit Thrombozyten in Entzündungsprozessen die Rekrutierung und Transmigration der Leukozyten aus dem Blut erleichtert. Daher sollte eine mögliche Bindung der RASF im murinen Blut an murine Blutplättchen immunhistochemisch analysiert werden. Zum Nachweis diente das auf Blutplättchen exprimierte Adhäsionsmolekül Glykoprotein Ib (GPIb), auch CD42b genannt.

#### 4.5.1. Nachweis von murinem CD42b in den Implantaten

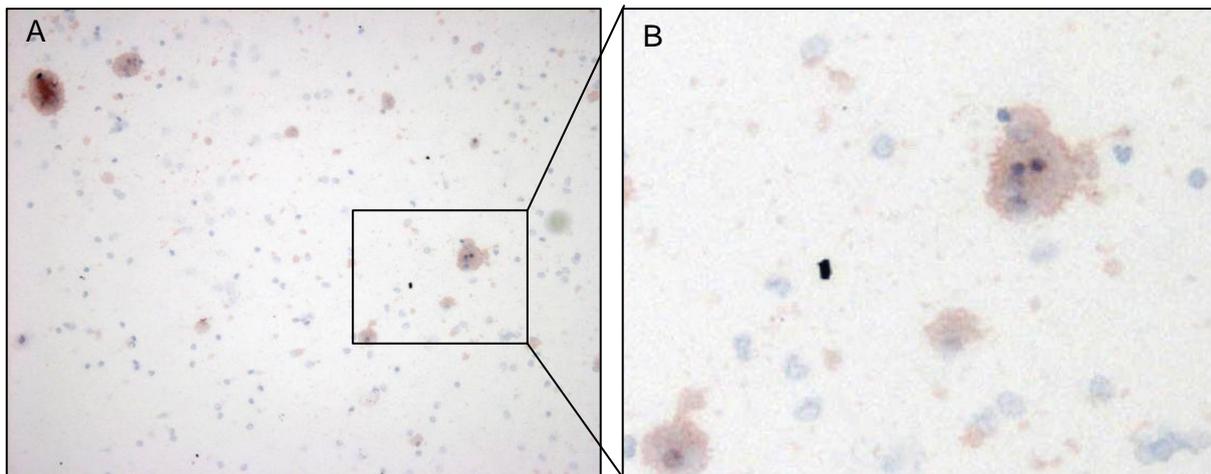
Kryokonservierte Implantate von Tag 3 und Tag 9 nach der Operation wurden immunhistochemisch analysiert. Ein Antikörpersignal gegen murines CD42b war im Implantat nach 3 Tagen, vor allem an der Innenseite der murinen Blutgefäße lokalisiert, zu finden (siehe Abb. 37 A). Durch die Gegenfärbung mit Hämalaun war das zellreiche murine Bindegewebe von der Gelatinematrix gut zu unterscheiden. Die Gelatinematrix wird ebenfalls mit Hämalaun angefärbt und ist als große, amorphe Struktur zu erkennen. Erkennbar war eine CD42b-abhängige Färbung der Gefäßwand und einzelner runder Strukturen im Lumen des Blutgefäßes, bei denen es sich um Blutplättchen handeln könnte. Auch außerhalb der murinen Gefäße gab es an Tag 9 im ipsilateralen Implantat vereinzelte CD42b-Signale an größeren Zellen (siehe Abb. 37 B). Um welchen Zelltyp es sich bei den großen CD42b-positiven Zellen handelt, muss in weiteren Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen geklärt werden.



**Abb. 37: CD42b-Expression in den SCID-Maus Implantaten.** (A) Übersicht eines ipsilateralen Implantats von Tag 3 nach der Operation; (B) Übersicht eines Implantates von Tag 9; (C) Vergrößerung eines Teilausschnittes von A; (D) Vergrößerung eines Teilausschnittes von B. Gegenfärbung mit Hämalaun. (A und C) Murine CD42b-Signale nach 3 Tagen an und in den murinen Gefäßen; (B und D) Murine CD42b-Signale nach 9 Tagen an einzelnen größeren Zellen innerhalb der Gelatinematrix aber außerhalb der murinen Gefäße.

#### 4.5.2. Nachweis von murinem CD42b in murinen Blut

Die Kolokalisation von humanen RASF und Thrombozyten in murinem Blut wurde mittels Zytospin und nachfolgender immunhistochemischer Färbung mit Antikörpern gegen murines CD42b untersucht (siehe 3.4. und 3.7.1.). Nach 30 Tagen konnten im Blut einer nach dem hier beschriebenen SCID-Maus Modell behandelten SCID-Maus CD42b assoziiert größere Zellen gefunden werden. Andere Zellen, von denen im Durchlicht nur die blauen Zellkerne zu erkennen waren, zeigten keine Kolokalisation mit CD42b (siehe Abb. 38). Für die Klärung, ob es sich bei den größeren Zellen um RASF handelt, müssten auch mit den Zytospin-Präparaten Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen durchgeführt werden. Die Immunfluoreszenz-Färbung für diesen Antikörper konnte im Rahmen der Arbeit noch nicht etabliert werden.



**Abb. 38: Anti-murine-CD42b Antikörper-Signale im murinen Blut.** (A) Übersicht eines Zytospin-Präparats, 30 Tage nach der Operation; (B) Vergrößerung eines Teilausschnittes mit einigen größeren und CD42b assoziierten Zellen. Gegenfärbung mit Hämalaun.

#### 4.6. Versuche zur Inhibition der RASF-Transmigration

Die Transmigration der RASF sollte mit RNase A, DNase 1 sowie verschiedenen DMARDs und Biologika gehemmt werden. Klinisch-therapeutisch wurde bis jetzt nur die Wirkung einer anderen RNase beschrieben, der Onkonase. Diese zytotoxische RNase zeigte einen tumorhemmenden Effekt und wird deshalb momentan in klinischen Studien untersucht (6). Der Effekt der DMARDs und Biologika, der sonst nur im Gesamtzusammenhang der

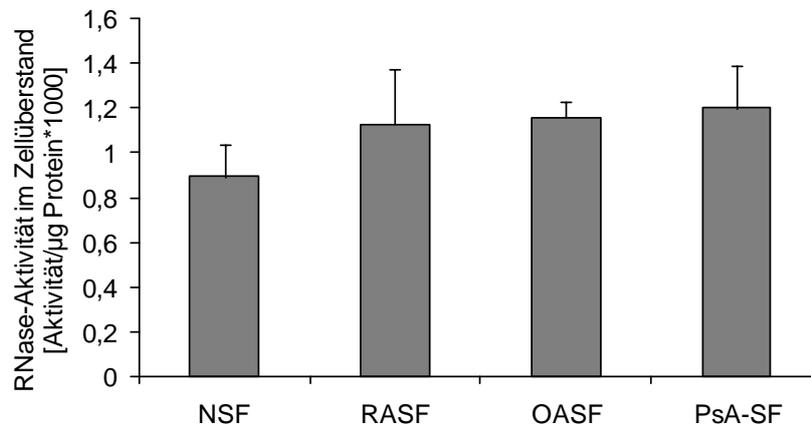
immunologischen Prozesse der RA beobachtet wird, sollte spezifisch hinsichtlich des Transmigrationsverhaltens der RASF untersucht werden.

#### **4.6.1. Einfluss extrazellulärer RNS und DNS**

Extrazelluläre RNS ist für die Permeabilität der Blut/Hirn-Schranke (24) von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund sollte getestet werden, ob RASF *in vitro* extrazelluläre RNS bzw. RNase in den Kulturüberstand abgeben. Die Wirkung extrazellulärer RNS sowie DNS und extrazellulärer RNase sowie DNase auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine (z. B. IL-6) wurde als Parameter zur Auswertung der RASF-Aktivität gemessen. Letztlich wurde der Effekt einer Zugabe von RNase oder DNase, also die Reduktion extrazellulärer RNS oder DNS im SCID-Maus Modell im Bezug auf das Verhalten der implantierten RASF untersucht. Hierfür wurde die Konzentration an extrazellulärer RNS und DNS im Blut der SCID-Mäuse durch eine intravenöse Applikation von RNase [42 µg/kg LG] oder DNase [42 µg/kg LG] reduziert.

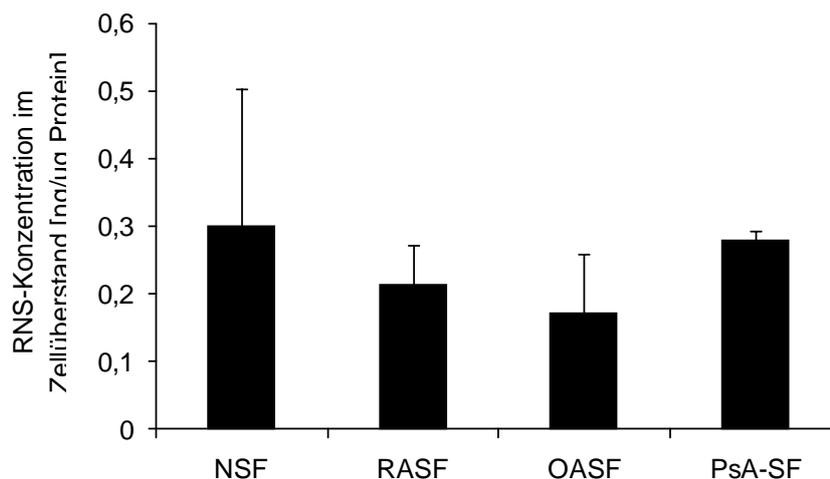
##### **4.6.1.1. Sekretion von RNase/exRNS durch RASF *in vitro***

Da noch keine Daten zur Sekretion von RNase und exRNS durch Fibroblasten bekannt waren, wurde die Konzentration der exRNS und RNase im Überstand von synovialen Fibroblasten von Patienten mit verschiedenen Gelenkerkrankungen (rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis und Psoriasisarthritis: PsA) sowie von gesunden Probanden (NFS) analysiert (siehe Abb. 39). Die Zellen wurden für diesen Versuch 24 Stunden in serumfreiem DMEM kultiviert, da FCS beim RNase-Aktivitäts-Test (siehe 3.8.5.) stört. Nach einer 24-stündigen Kultur in serumfreiem DMEM zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den Mengen der sezernierten RNase zwischen den untersuchten Gruppen von SF (gesunde Probanden, RA, OA und PsA). Tendenziell schienen die SF von Patienten mit Gelenkerkrankungen eine höhere Sekretion von extrazellulärer RNase (RASf =  $1,13 \pm 0,24$ ; OASF =  $1,16 \pm 0,07$ ; PsA-SF =  $1,20 \pm 0,19$ ) im Vergleich zu gesunden Probanden ( $0,89 \pm 0,15$ ) aufzuweisen. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Somit konnte gezeigt werden, dass SF in der Lage sind extrazelluläre RNase zu produzieren. Es trat während des Versuchs keine veränderte oder vermehrte Apoptose der kultivierten SF auf.



**Abb. 39: RNase-Aktivität im Zellkulturüberstand verschiedener SF-Populationen (Mittelwert±SEM).** Die Aktivität der RNase wurde, wie unter 3.8.5. beschrieben, gemessen und ins Verhältnis zur Proteinkonzentration des Zellpellets gesetzt. NFS: synoviale Fibroblasten von gesunden Probanden (n = 2), PsA-FS: synoviale Fibroblasten von Patienten mit Psoriasisarthritis (n = 2), RASF (n = 3), OASF (n = 3). Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den SF-Kulturen feststellbar. Eine tendenzielle Erhöhung der Menge an sezernierter RNase bei den Überständen der SF von Patienten mit Gelenkveränderungen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Außerdem wurde festgestellt, dass alle SF-Populationen exRNS in die Kulturüberstände (siehe Abb. 40) sezernieren. Die Menge an sezernierter extrazellulärer RNS wies bei den untersuchten Gruppen (NSF =  $0,30 \pm 0,20$ ; RASF =  $0,22 \pm 0,06$ ; OASF =  $0,17 \pm 0,09$ ; PsA-SF =  $0,28 \pm 0,01$ ) keine signifikanten Unterschiede auf. Die größten Schwankungen waren in der Kontrollgruppe der gesunden Probanden festzustellen.

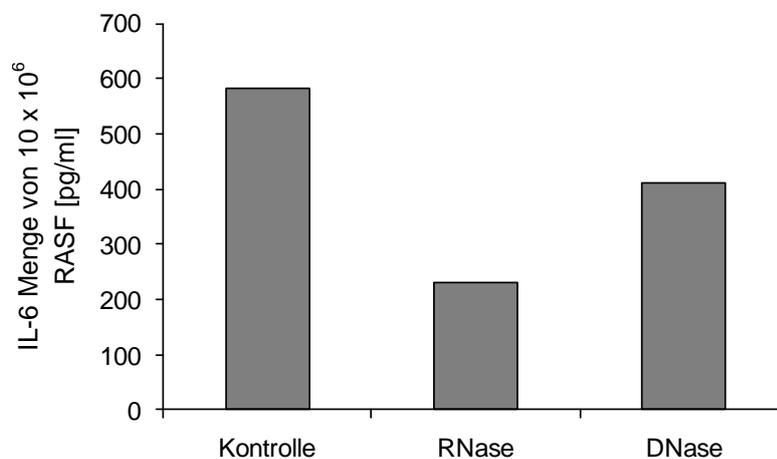


**Abb. 40: RNS-Konzentration im Zellkulturüberstand verschiedener SF-Populationen (Mittelwert±SEM).** Die RNS-Konzentration wurde photometrisch gemessen (wie unter 3.6.1. beschrieben) und im Verhältnis zur Proteinkonzentration des Zellpellets angegeben. NSF: synoviale Fibroblasten von gesunden Probanden (n = 2), PsA-SF: synoviale Fibroblasten von Patienten mit Psoriasisarthritis (n = 2), RASF (n = 3), OASF (n = 2). Die Menge an extrazellulär abgegebener RNS wies bei allen SF-Populationen keine signifikanten Unterschiede auf.

#### 4.6.1.2. Effekte der Stimulierung von RASF mit RNase/DNase *in vitro*

Der Effekt von extrazellulärer RNase (RNase A) und extrazellulärer DNase (DNase1) auf die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch RASF wurde *in vitro* überprüft. Die RASF wurden, wie unter 3.1.14. beschrieben, stimuliert und als Analyseparameter wurde die IL-6-Konzentration im Kulturüberstand gemessen.

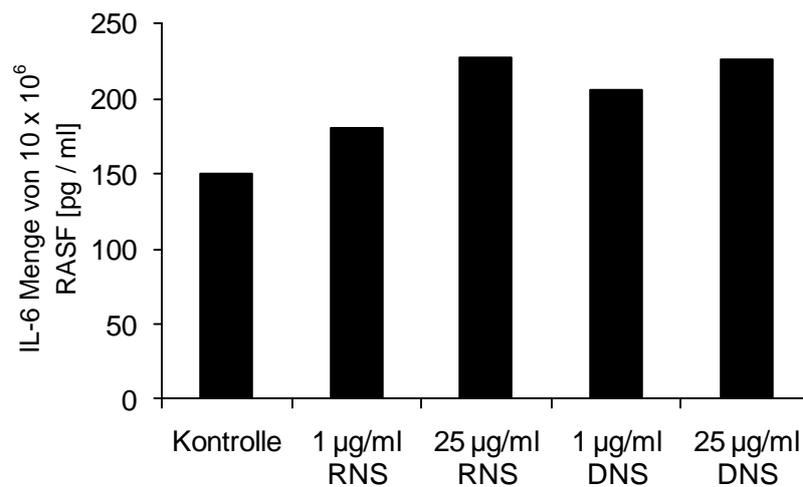
Die sezernierte IL-6 Menge im Überstand der RASF konnte sowohl durch die Zugabe von RNase als auch von DNase im Vergleich zur Kontrolle reduziert werden (siehe Abb. 41). Dies weist darauf hin, dass die von den RASF produzierte exRNS und exDNS pro-entzündliche Effekte auf RASF ausübt.



**Abb. 41: Sezerniertes IL-6 im Zellkulturüberstand von mit RNase bzw. DNase stimulierten RASF.** Für die Kontrolle wurden RASF für 15 Stunden mit autologem konditioniertem Medium stimuliert. Die DNase-Gruppe erhielt zusätzlich 1 µg/ml DNase und die RNase-Gruppe 1 µg/ml RNase während der 15 Stunden. Das Experiment wurde mit einer RASF-Population durchgeführt.

Die RASF wurden in serumreduziertem Medium (2% FCS) und unterschiedlichen Konzentrationen an autologer DNS bzw. RNS für 15 Stunden stimuliert, um zu testen, ob die Zugabe von exRNS bzw. exDNS einen gegensätzlichen Effekt auf die Sekretion von IL-6 in den Zellkulturüberstand hat als die Zugabe von RNase bzw. DNase.

Durch die Zugabe von autologer RNS bzw. autologer DNS konnte die Sekretion von IL-6 in den Zellkulturüberstand konzentrationsabhängig erhöht werden (siehe Abb. 42). Die isolierte genomische DNS bzw. RNS unterscheidet sich vermutlich von der exRNS und exDNS in den konditionierten Kulturüberständen. Dennoch konnte im ersten Versuch eine stimulierende Wirkung auf die RASF-vermittelte IL-6 Produktion beobachtet werden.



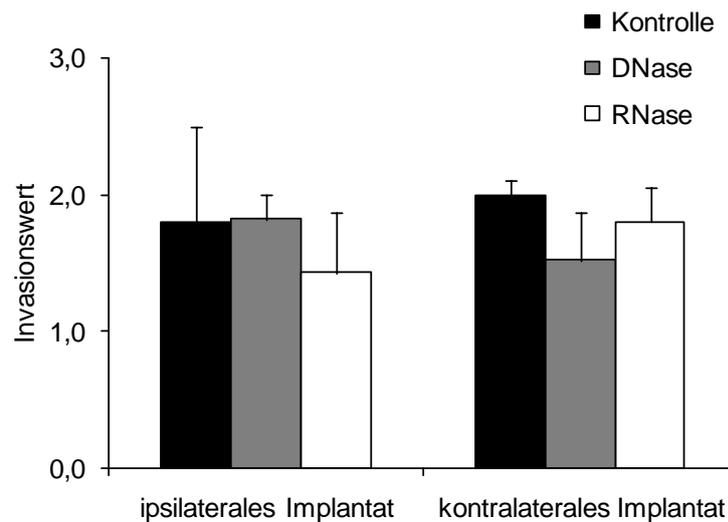
**Abb. 42: Sezerniertes IL-6 im Zellkulturüberstand der mit DNS und RNS stimulierten RASF.** Für die Kontrolle wurden RASF für 15 Stunden in serumreduziertem Medium (2% FCS) kultiviert. Die erste RNS-Gruppe erhielt zusätzlich 1 µg/ml und die zweite 25 µg/ml autologe RNS für 15 Stunden. Die erste DNS-Gruppe erhielt zusätzlich 1 µg/ml und die zweite 25 µg/ml autologe DNS für 15 Stunden. Das Experiment wurde mit einer RASF-Population durchgeführt.

#### 4.6.1.3. Effekte intravenös applizierter RNase oder DNase *in vivo*

Die Wirkung einer erhöhten Konzentration von zirkulierender RNase oder DNase im Blut auf das Transmigrationsverhalten der RASF wurde mit Hilfe des SCID-Maus Modells *in vivo* analysiert. Die Applikation erfolgte jeweils dreimal wöchentlich intravenös.

##### *Experiment 1, Dauer 60 Tage*

Bei diesem Experiment wurde im SCID-Maus Modell DNase oder RNase über 60 Tage injiziert. Bei RNase-Behandlung konnte eine leichte Reduktion der Invasion des ipsilateralen Implantats beobachtet werden. Beim kontralateralen Implantat war dagegen bei der DNase-Behandlung eine geringe Reduktion der Invasion zu beobachten. Beide Werte erreichten jedoch keine statistische Signifikanz (siehe Abb. 43). Die Transmigration der RASF in den kontralateralen Knorpel unterschied sich zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant.

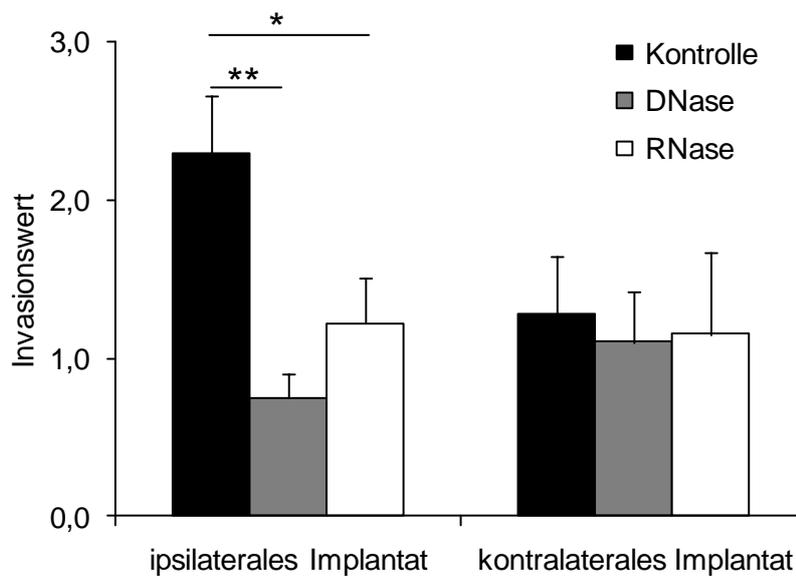


**Abb. 43: Invasivität (Mittelwert $\pm$ SEM) der RASF nach Behandlung mit DNase bzw. RNase im SCID-Maus Modell über 60 Tage.** Nach einer dreimal wöchentlichen i.v. Injektion von 42  $\mu$ g/kg LG DNase (■, n = 3) bzw. 42  $\mu$ g/kg LG RNase (□, n = 5) im Vergleich zu physiologischer Kochsalzlösung (■, n = 5) zeigte sich keine signifikante Reduktion der Invasion.

#### *Experiment 2, Dauer 45 Tage*

Da die Applikation von RNase bzw. DNase nach 60 Tagen keine signifikante Reduktion der Invasion aufwies, sollte das Ergebnis mit einem kürzeren Beobachtungszeitraum über 45 Tage verglichen werden. Dadurch wurde eine mögliche zu späte Analyse des 60 Tage dauernden Versuchs vermieden. Während eines zu langen Zeitraums könnten die Effekte der DNase bzw. RNase auf die RASF-Invasion durch die Wirkung anderer pro-inflammatorischer Faktoren überlagert werden.

Nach 45 Tagen Versuchsdauer zeigte sich, im Gegensatz zum Versuch nach 60 Tagen, dass die SCID-Mäuse, die dreimal wöchentlich i.v. mit 42  $\mu$ g/kg LG DNase oder RNase behandelt worden waren, eine deutliche Reduktion der Invasion im ipsilateralen Knorpel im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $2,30\pm 0,36$ ) aufwiesen (siehe Abb. 44). Die Reduktion der Invasion war in beiden Fällen signifikant (DNase:  $0,75\pm 0,15$  mit  $p = 0,0072$  und RNase:  $1,22\pm 0,29$  und  $p = 0,0479$ ). Die Migration der RASF zum und die Invasion in den kontralateralen Knorpel blieben unverändert.



**Abb. 44: Invasivität (Mittelwert±SEM) der RASF nach Behandlung mit DNase bzw. RNase im SCID-Maus Modell über 45 Tage.** Die erste Versuchsgruppe (■, n = 4) war die Kontrollgruppe, bei der physiologische Kochsalzlösung i. v. appliziert wurde, die zweite Gruppe (■, n = 4) erhielt 42 µg/kg LG DNase und die dritte Gruppe (□, n = 5) erhielt 42 µg/kg LG RNase i.v. appliziert. \* p < 0,05, \*\* p < 0,001.

#### 4.6.2. Effekte von DMARDs, Biologika und eines Proteasomen-Inhibitors

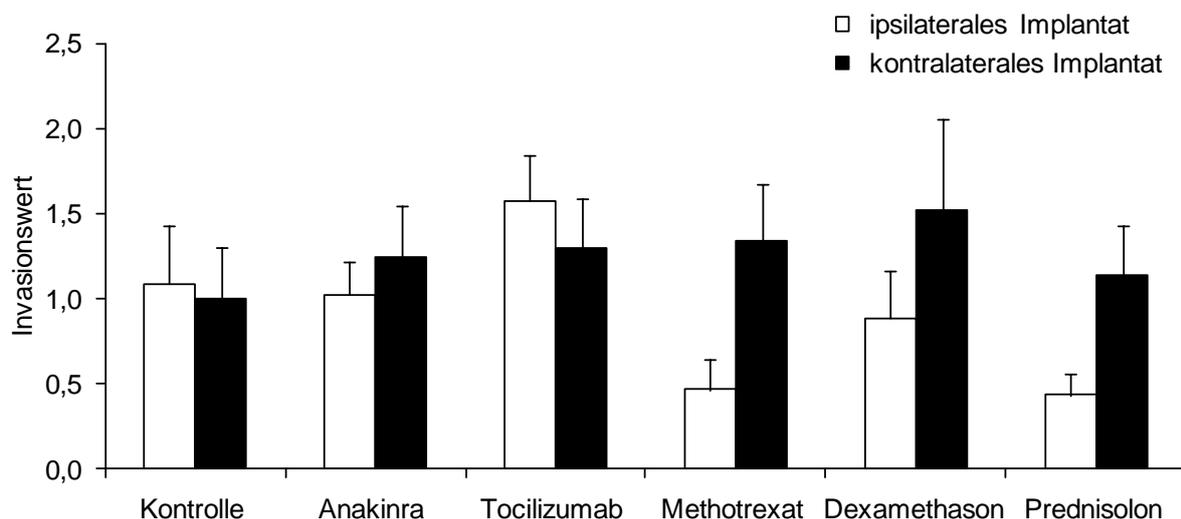
Das SCID-Maus Modell wurde für diesen Versuch entsprechend der Versuche mit RNase und DNase angepasst. Den Tieren wurden während des 60 Tage dauernden Versuchs DMARDs, Biologika oder der Proteasomen-Inhibitor entsprechend der therapeutischen Dosierung von RA-Patienten intraperitoneal (i.p.) injiziert. Analyseparameter waren die Effekte der Therapeutika auf die Knorpelinvasion in das ipsilaterale Implantat, die Hemmung der Fibroblasten-Migration zum kontralateralen Implantat und die Invasion der RASF in das kontralaterale Implantat.

##### *Experiment 1 (Glukokortikoide, Methotrexat, Anakinra und Tocilizumab)*

Die SCID-Mäuse wurden nach der Operation (Einsetzen des ipsi- und des kontralateralen Implantats) in 6 Gruppen aufgeteilt. Jede Gruppe erhielt jeweils i.p. verabreichte Therapeutika. Alle Medikamente wurden in entsprechend der für den Menschen üblichen Konzentration auf das Gewicht der Maus bezogen appliziert.

Die Ergebnisse der Invasionsanalyse sind in Abb. 45 dargestellt. Die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelte Kontrollgruppe zeigte einen Invasionswert von  $1,09 \pm 0,34$  auf der ipsilateralen Seite und einen ähnlichen Wert von  $1,00 \pm 0,30$  auf der kontralateralen Seite. Die mit Anakinra behandelte Gruppe hatte ungefähr den gleichen Invasionswert wobei die Invasion kontralateral erhöht war (ipsilateral:  $1,03 \pm 0,19$ ; kontralateral:  $1,24 \pm 0,30$ ). In der dritten, mit Tocilizumab behandelten Gruppe war eine auf beiden Seiten erhöhte Invasion zu beobachten (ipsilateral  $1,58 \pm 0,27$  und kontralateral  $1,30 \pm 0,29$ ). Die Behandlung mit Methotrexat hatte einen um die Hälfte reduzierten Invasionscore der ipsilateralen Seite zur Folge ( $0,47 \pm 0,17$ ). Im Gegensatz dazu war die kontralaterale Invasion im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erhöht und etwa auf dem gleichen Level wie die kontralaterale Invasion der Anakinra- und der Tocilizumab-Gruppe ( $1,30 \pm 0,29$ ).

Die Glukokortikoide führten neben Methotrexat zur deutlichsten Reduktion auf der ipsilateralen Seite. Die mit Dexamethason behandelten SCID-Mäuse wiesen in diesem Experiment eine Reduktion der Invasion im ipsilateralen Knorpel auf, kontralateral zeigte sich aber die stärkste Invasion aller Behandlungsgruppen (ipsilateral  $0,88 \pm 0,28$  und kontralateral  $1,52 \pm 0,53$ ). Die mit Prednisolon behandelte Gruppe zeigte die stärkste Reduktion der Invasion in den ipsilateralen Knorpel, die im Vergleich zur Kontrollgruppe um mehr als die Hälfte reduziert war ( $0,43 \pm 0,13$ ). Die Invasion in den kontralateralen Knorpel war auf dem gleichen Level wie die kontralaterale Invasion der Kontrollgruppe ( $1,13 \pm 0,30$ ).



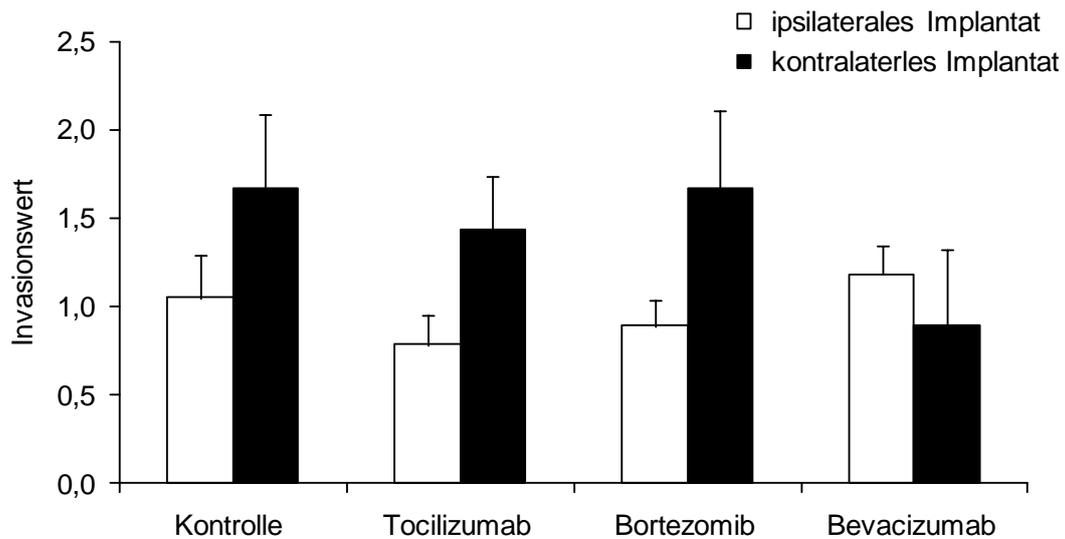
**Abb. 45: Invasion (Mittelwert $\pm$ SEM) der RASF in den ipsi- und kontralateralen Knorpel nach der Behandlung mit i.p. verabreichten Medikamenten.** Die Kontrolle (n = 8) erhielt dreimal wöchentlich physiologische Kochsalzlösung, die Anakinra-Gruppe (n = 8) dreimal wöchentlich  $1,25 \mu\text{g/g}$  LG, die Tocilizumab-Gruppe (n = 8) einmal pro Woche  $8 \mu\text{g/g}$  LG, die Methotrexat-Gruppe (n = 6) zweimal wöchentlich  $1 \mu\text{g/g}$  LG, die Dexamethason-Gruppe (n = 6) zweimal wöchentlich  $0,5 \mu\text{g/g}$  LG und die Prednisolon-Gruppe (n = 6) bekam zweimal wöchentlich  $4 \mu\text{g/g}$  LG. Die Substanzen wurden für die i.p. Applikation in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Versuchsdauer betrug 60 Tage.

Insgesamt war die Invasion der verwendeten RASF nach 60 Tagen im Vergleich zu anderen SCID-Maus Modell Versuchen gering. Bemerkenswert war jedoch, dass alle untersuchten DMARDs auf der ipsilateralen Seite einen invasionsreduzierenden Effekt zeigten. Die beiden verwendeten Biologika zeigten diesen Effekt nicht oder hatten im Fall von Tocilizumab einen invasionsfördernden Effekt. Eine Reduktion der Invasion in die kontralaterale Seite konnte interessanterweise durch keines der untersuchten Medikamente erreicht werden.

Die fotografische Dokumentation der Vaskularisierung zeigte ebenfalls eine geringe Reduktion der in die Gelatinematrix sprossenden Kapillaren in der Prednisolon-Gruppe (siehe Anhang Abb. 53).

#### *Experiment 2, Biologika und der Proteasom-Inhibitor*

Im zweiten Experiment wurden erneut Tocilizumab aufgrund seines bereits beobachteten invasionsfördernden Effekts sowie Bevacizumab und Bortezomib untersucht. Die Kontrollgruppe wurde, wie im ersten Experiment, mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Der Invasionswert des zweiten Experiments war bei der Kontrollgruppe auf der kontralateralen Seite ( $1,67 \pm 0,42$ ) höher als auf der ipsilateralen Seite ( $1,05 \pm 0,24$ ) (siehe Abb. 46). Normalerweise ist im SCID-Maus Modell die kontralaterale Seite nach 60 Tagen nicht so stark invadiert wie die ipsilaterale Seite. Die Invasivität der RASF war stärker als beim ersten Experiment. Die Tocilizumab-Gruppe wies eine minimale Verringerung der Invasion auf beiden Seiten im Verhältnis zur Kontrollgruppe auf, die aber nicht signifikant war (ipsilateral  $0,78 \pm 0,15$ ; kontralateral  $1,43 \pm 0,44$ ). Auch die Invasion in der Bortezomib-Gruppe entsprach auf beiden Seiten in etwa dem Invasionsniveau der Kontrolle (ipsilateral  $0,89 \pm 0,16$ ; kontralateral  $1,67 \pm 0,43$ ). Die mit Bevacizumab behandelte Gruppe ließ als Einzige einen reduzierten Invasionswert auf der kontralateralen Seite erkennen ( $0,89 \pm 0,20$ ). Die Invasion der ipsilateralen Seite ( $1,18 \pm 0,23$ ) war jedoch im Vergleich zur Kontrolle etwas erhöht.



**Abb. 46: Vergleich der Invasion (Mittelwert $\pm$ SEM) der RASF in den ipsi- und in den kontralateralen Knorpel nach Behandlung mit i.p. verabreichten Medikamenten.** Die Kontrolle (n = 6) erhielt dreimal wöchentlich physiologische Kochsalzlösung, die Tocilizumab-Gruppe (n = 6) einmal pro Woche 8  $\mu$ g/g LG, die Bortezomib-Gruppe (n = 6) 1  $\mu$ g/g LG an Tag 1, 3, 6, 10 und 14, dann folgte eine 10-tägige Pause und der Zyklus begann von neuem, die Bevacizumab-Gruppe (n = 6) einmal wöchentlich 5  $\mu$ g/g LG. Die Medikamente wurden in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Versuchsdauer betrug 60 Tage.

Die fotografische Dokumentation der Vaskularisierung zeigte ebenfalls eine geringe Reduktion der in die Gelatinematrix sprossenden Kapillaren in der Bevacizumab-Gruppe (siehe Anhang Abb. 53). Ansonsten waren keine Veränderungen zu beobachten.

#### 4.7. Perichondrozytäre Knorpeldegradation

Die perichondrozytäre Knorpeldegradation wies bei den SCID-Maus-Versuchen nur marginale Unterschiede zwischen den jeweiligen Untersuchungsgruppen auf. Beim zweiten Experiment zur Untersuchung der Effekte von DMARDs, Biologika und eines Proteasom-Inhibitors (siehe 4.6.2.) lag beispielsweise der Unterschied zwischen der kontralateralen Knorpeldegradation der Kontrolle im Vergleich zur kontralateralen Knorpeldegradation der mit Bevacizumab behandelten Tiere nach dem studentischen t-Test nur bei  $p = 0,321$ . Dies traf auf alle weiteren Experimenten zu, deshalb wurde in der Dissertation auf die Präsentation der perichondrozytären Knorpeldegradation für die SCID-Maus-Versuche verzichtet.

## 5. DISKUSSION

RASF sind an der Pathophysiologie der RA maßgeblich beteiligt (39, 57 und 76). Aufgrund ihrer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen sind sie in der Lage, an Knorpelmatrix zu adhären und durch die Expression von MMP die Knorpelmatrix zu invadieren und zu degradieren (39 und 57). Außerdem haben sie durch die Produktion von pro-entzündlichen und Angiogenese-fördernden Faktoren eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung des entzündlichen Niveaus im Synovialgewebe (76). In unserer Arbeitsgruppe wurde außerdem kürzlich das erhöhte Migrationspotential von RASF über Gewebegrenzen hinaus über das Gefäßsystem beschrieben (57). Durch diese Entdeckung der Migrationsfähigkeit von RASF im Mausmodell und der Tatsache, dass die Zellen vermehrt im Blut und in der Milz zu finden waren (57), ergab sich die Frage nach den Mechanismen dieser Migration. Aus diesem Grund wurde der Schwerpunkt der vorliegenden Promotionsarbeit auf die Untersuchungen dieser Mechanismen des spezifischen Migrationsverhaltens von RASF gelegt. Im Vordergrund standen hierbei Analysen zur Kinetik der transendothelialen Migration und der Interaktion mit den Endothelzellen.

Zur Analyse der endothelialen Interaktion der RASF wurde vor allem die Expression von Adhäsionsmolekülen auf RASF untersucht. Zusätzlich wurde die Bindung von RASF an bekannte endotheliale Adhäsionsmoleküle funktionell analysiert. Ein weiterer wichtiger Punkt war die Analyse der Interaktion von Thrombozyten mit RASF. Nachdem bestimmte Mechanismen zur Gefäß-RASF-Interaktion identifiziert werden konnten, wurden inhibitorische Studien durchgeführt, um das invasive und migratorische Verhalten der RASF zu blockieren bzw. die Bedeutung dieser Adhäsionsmechanismen zu bestätigen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten Einblicke in den Ablauf und die Mechanismen der RASF-Migration geben, um Voraussetzungen für neue Therapieansätze zu identifizieren, die eine Ausbreitung von RASF zu nicht erodierten Gelenkarealen und Gelenken verhindern könnten.

### 5.1. Kinetik der RASF-Transmigration im SCID-Maus Modell

In früheren Untersuchungen unseres Labors konnte gezeigt werden, dass RASF von der ipsilateralen Implantationsseite zum kontralateralen Implantat migrieren (57). Die Migration findet hierbei über das Blutgefäßsystem statt (57). Im ersten Schritt der vorliegenden Arbeit wurden die zeitlichen Abläufe untersucht, die letztendlich zur Migration und Invasion der RASF in den kontralateralen Knorpel führen. Ein Schwerpunkt der Analysen zur

Migrationskinetik lag auf der Induktion der Gefäßneubildung und der Dauer des Aufenthalts der RASF im Blut, da RASF nachgewiesen die bisher einzigen Fibroblasten sind, die durch das Gefäßsystem migrieren können.

### **5.1.1. Zeitlicher Ablauf der Transmigration im SCID-Maus Modell**

In den unter 4.1. und 4.2. beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Kinetik der RASF-bedingten Knorpelinvasion und die Transmigration der RASF im SCID-Maus Modell in mehreren Schritten abläuft. Der zeitliche Ablauf besteht aus:

- 1.) Induktion einer RASF-bedingten Gefäßneubildung außerhalb der Gelatinematrix auf der ipsilateralen Seite
- 2.) Induktion einer weiteren Gefäßneubildung innerhalb der Gelatinematrix vor allem auf der ipsilateralen Seite
- 3.) Anreicherung der humanen RASF in den murinen Milzen
- 4.) Adhäsion und Invasion der RASF an den koimplantierten Knorpel auf der ipsilateralen Seite, danach erfolgte die Adhäsion und Invasion der RASF an den Knorpel auf der kontralateralen Seite

Im Detail basieren diese Abläufe auf folgenden Mechanismen.

#### **5.1.1.1. Induktion einer RASF-bedingten Gefäßneubildung außerhalb der Gelatinematrix**

Schon nach 1,5 Tagen konnte bei zwei von drei Zeitverlaufversuchen eine sehr frühe Gefäßinduktion auf der ipsilateralen Seite (mit RASF implantierter Knorpel) außerhalb der Gelatinematrix beobachtet werden. Bei einem Zeitverlaufversuch liegen keine Daten zur Gefäßneubildung während dieser frühen Zeitpunkte vor, da der erste Analysezeitpunkt am Tag 6 erfolgte. Verschiedene Kriterien sprechen dafür, dass es sich dabei um die arteriogenen Veränderungen von Kollateralgefäßen handelt (siehe 1.6.2.1.). Diese Kriterien sind die korkenzieherartige Form (88, 91, 92 und 94) sowie eine veränderte Gefäßwandstruktur, die mit einer Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung im Implantat nachgewiesen werden konnte (Abb. 36). Diese veränderte Gefäßwandstruktur beruht auf der

Reduktion des  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), die typisch für die Arteriogenese ist (14). In der Forschung zum Ablauf der Arteriogenese wird experimentell die Reifung der Kollateralen zu Arterien durch das Verschließen von größeren Gefäßen und einem daraus resultierenden erhöhten Blutfluss induziert (13, 14, 28, 41, 54, 81, 86 und 92). So konnten Scholz *et al.* nach einem künstlichen Gefäßverschluss bis zu Tag 2 als einzige Veränderung einen erhöhten Blutfluss beobachten (91). In unserem Modell wird die arteriogeneseartige Veränderung der Kollateralen vermutlich durch einen löslichen Faktor stimuliert, da eine Induktion durch Zell-Zell-Kontakte der Gefäße mit RASF innerhalb der kurzen Zeit sehr unwahrscheinlich ist und ein Gefäßverschluss nicht herbeigeführt wurde. Es wird postuliert, dass Wachstumsfaktoren wie VEGF, *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) oder *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF-2) und das Chemokin MCP-1, die von RASF produziert werden an der Arteriogenese beteiligt sind (39, 80, 28, 41 und 54). Im Gegensatz zu den publizierten Ergebnissen steht, dass die Arteriogenese in unserem Modell schon nach 35 Stunden nachzuweisen war. Eine mögliche Antwort darauf könnte sein, dass die von den RASF sezernierten Arteriogenese-beeinflussenden Faktoren, die Monozyten-Rekrutierung schneller und unabhängig von der Flussrate im Blut induziert. Diese frühe RASF bedingte Arteriogenese war unerwartet, da bis jetzt nicht bekannt war, dass RASF diesen Prozess induzieren. Es bleibt zu klären ob die von SF induzierte Arteriogenese nur im SCID-Maus Modell zu beobachten ist oder ob die Induktion der Gefäßneubildung auch in der RA oder anderen entzündlichen Gelenkerkrankungen eine Rolle spielt. Interessanterweise wurden korkenzieherartige Gefäße auch bei Patienten mit Psoriasisarthritis beobachtet (23). Das könnte für die Pathogenese in der RA bedeuten, dass die erhöhte Gefäßdichte im Synovium nicht nur auf die Induktion von Angiogenese zurückzuführen ist sondern, dass während der frühen Phase der RA auch eine verstärkte Arteriogenese möglich ist

#### **5.1.1.2. Induktion einer Gefäßneubildung innerhalb der Gelatinematrix**

Ab Tag 6 war eine veränderte Gefäßneubildung zu beobachten, die sich durch sehr kleine Blutgefäße auszeichnete, die in die Gelatinematrix hineinsprossen (siehe Abb. 18 G-L und Anhang Abb. 51 und 52). Diese weitere Gefäßneubildung war nicht so schnell und intensiv wie die erste. Die Gefäße waren sehr englumig und ihr Aufbau meist gradlinig und zu den Enden hin verjüngend. Es ist bekannt, dass Fibroblasten, die an der Wundheilung beteiligt sind Angiogenese induzieren können (42) und das RASF Angiogenese-fördernde Faktoren sezernieren (39). Die zweite, spätere Induktion der Gefäßneubildung war deutlich von der ersten an der Oberfläche lokalisierten Induktion zu unterscheiden. Hierbei muss es sich um

einen anderen, RA-spezifischeren Prozess als die Kollateralenreifung (Arteriogenese) handeln, da innerhalb der Gelatinematrix keine Kollateralgefäße enthalten sind. Als mögliche Mechanismen dieser Neovaskularisierung kommen Angiogenese oder Vaskulogenese in Frage, die für die Versorgung des Implantat-Inneren verantwortlich ist. Die immunhistochemische Analyse der Implantate auf den Endothelzellmarker CD31 (siehe 4.1.2.2.) zeigt eine Zunahme der CD31 positiven Zellen ab Tag 12 innerhalb der Gelatinematrix. Allerdings konnte mit diesem Versuch die Art der Gefäßneubildung nicht zwischen Angiogenese oder Vaskulogenese unterschieden werden, da sowohl ausdifferenzierte Endothelzellen als auch EPC CD31 exprimieren. Am darauffolgenden Analysezeitpunkt (Tag 18) konnten die CD31+ Zellen kontralateral nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 19 F). Der Nachweis von CD31+ Zellen an Tag 12 (Abb. 19 D) könnte daran liegen, dass der Knorpel bei diesem Zeitpunkt sehr weit am Rand des Implantats lag. Aus diesem Grund hätte der RASF rekrutierende Faktor schneller ins Blut gelangen können und somit die RASF schneller zum Knorpel transmigrieren ließ. Eine Doppelmarkierung mit murinem CD31 und murinem CD133, einem EPC-Marker, sollte klären, ob es sich bei dieser Gefäßneubildung um Angiogenese oder Vaskulogenese handelt. Die vollständige Etablierung der Doppelmarkierung konnte im Rahmen der Dissertation aber noch nicht abgeschlossen werden.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass RASF die Angiogenese oder Vaskulogenese induzieren. Im Verlauf der RA ist eine deutlich erhöhte Vaskularisierung des Synovialgewebes zu beobachten (9, 22, 103 und 105). Aus den Ergebnissen aus Teil 4.1.2.1. und den Abbildungen 51 und 52 im Anhang lässt sich schlussfolgern, dass die RASF möglicherweise zu einem größeren Anteil für die in der RA beschriebene Gefäßneubildung verantwortlich sind, als bisher angenommen wurde. Aus diesem Grund wurden die frühzeitig gebildeten Gefäße im Rahmen der Arbeit näher charakterisiert.

Schon jetzt wird die Hemmung der Angiogenese als therapeutische Intervention für die RA untersucht, hat aber bis jetzt noch zu keinen klinisch relevanten Ergebnissen geführt (54). Unter 4.6.2., ist die Reduktion der RASF-Invasion auf der kontralateralen Seite durch den Angiogenesehemmer Bevacizumab dargestellt. Auch die fotografische Dokumentation der Implantate zeigte eine deutlich reduzierte Gefäßeinsprossung nach der Behandlung mit Bevacizumab (Anhang Abb. 53). Dieses Experiment zeigt das Ausmaß der VEGF-Hemmung. Durch Bevacizumab werden wahrscheinlich alle drei Gefäßneubildungsarten reduziert, da VEGF an allen Vaskularisierungsprozessen beteiligt ist und zusätzlich die Permeabilität der Gefäße reduziert, die bei allen Gefäßneubildungsprozessen erhöht ist.

### *Migration der RASF zu den Gefäßen*

Die Frage, wann und wie die RASF in direkte Nähe zu den Gefäßen gelangen, war eine zentrale Fragestellung, die bereits am Anfang der Untersuchungen gestellt wurde. Ein Teil der Strecke kann durch die Induktion von Gefäßneubildung überwunden werden. Der letzte Schritt bis zur direkten Adhäsion an die Gefäßwand wurde in den Experimenten noch nicht analysiert. Deshalb lässt sich über den chemotaktisch wirksamen Reiz nur spekulieren. Auch für dendritische Zellen ist bekannt, dass sie gezielt migrieren. Die genauen Abläufe und beteiligten Moleküle der gerichteten Migration von dendritischen Zellen sind aber noch nicht genau analysiert worden (87). Aus der Literatur geht aber hervor, dass Fibroblasten nach einer Laminin-Bindung ein verstärktes Migrationsverhalten aufweisen (60). Die Konzentration von Laminin erhöht sich während des Verlaufs der RA in der Synovialmembran (1), was zu einer Induktion der verstärkten Migration führen kann. Diese verstärkte Migration könnte die RASF die Restdistanz bis zur Basalmembran der Gefäßwand überwinden lassen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass RASF eine erhöhte Chemotaxis auf Komponenten der Knorpelmatrix aufweisen (76). Da die ECM der Knorpelmatrix teilweise mit der ECM der Basallamina übereinstimmt, könnten die gleichen Bestandteile, die die gerichtete Migration (Chemotaxis) der RASF auf die Knorpelmatrix hin induzieren, auch die Chemotaxis in Richtung Gefäßwand veranlassen. Zusammengefasst scheint das entzündete Synovium die Migration der RASF zur ECM des Knorpels (57) und zu der Blutgefäßwand zu erhöhen.

### *Vergleich der Gefäßneubildungsinduktion bei RASF versus OASF*

OASF-Fibroblasten zeigen keine Migration von der ipsi- zur kontralateralen Seite im SCID-Maus Modell (57). Darum sollte ein Experiment klären, ob die Angiogenese-Induktion ein ursächlicher Unterschied im Verhalten der RASF zu den OASF ist. Hierzu wurde die Intensität und Geschwindigkeit der Angiogenese-Induktion zwischen OA- und RASF verglichen. Es stellte sich heraus, dass sich die Angiogenese-Induktionskapazität von RA- und OASF nicht unterscheidet (siehe Abb. 20 und Abb. 21). Somit scheint die Arteriogenese-Induktion SF-spezifisch zu sein, ist aber nicht für das unterschiedliche Migrationsverhalten zwischen transmigrierenden RASF und ortsständigen OASF verantwortlich. Während der Durchführung der Experimente wurde eine Arbeit zur Induktion einer Gefäßneubildung publiziert (20). Durch diese Publikation wurden die unter 4.1.3. dargestellten Daten verifiziert und sie unterstreicht die momentane Aktualität des Themas in der rheumatologischen Grundlagenforschung. Die Autoren zeigen in einem anderen Tier-Modell, dass sowohl RASF als auch OASF Angiogenese induzieren können. In dem Artikel werden die verschiedenen isolierten Fibroblasten (RASF, OASF synoviale Fibroblasten von gesunden Probanden und

normale Hautfibroblasten) in einem Matrigel-Pfropfen unter der Haut der SCID-Mäuse platziert (20). Im Unterschied zu unseren Ergebnissen wurde die Angiogenese-Induktion von der anderen Gruppe nicht in Verbindung mit der RASF-Migration gesehen.

### **5.1.1.3. Nachweis humaner RASF im murinen Blut und in den murinen Milzen**

Bereits nach 6 Tagen und ununterbrochen bis Tag 30 konnte humanes Vimentin als Marker für die migrierenden humanen Zellen in den murinen Milzen immunhistologisch nachgewiesen werden (siehe Abb. 23). Deshalb ist anzunehmen, dass die RASF sich sehr früh im murinen Blutkreislauf befinden. Es ist eine leichte Erhöhung der Menge an humanem Vimentin von Tag 6 zu Tag 12 zu beobachten, danach blieb das Vimentin-Signal in etwa konstant (Abb. 23).

Die frühe Transmigration der RASF ins Blutgefäßsystem kann durch die Gefäßlumen-Vergrößerung während der Arteriogenese bedingte sein, die immer eine gleichzeitige Erhöhung der Permeabilität der Gefäße zur Folge hat (86), was den Übertritt der RASF erleichtern würde.

Humane RASF sind im murinen Blut der SCID-Mäuse nachweisbar (siehe Abb. 22). Um eine Aussage über die Menge der im blutbefindlichen RASF im Zeitverlauf machen zu können, wurde die DNS aus den Blutzellen der SCID-Mäuse von zwei Zeitverlaufsversuchen isoliert und sollte mit Hilfe verschiedener Oligonukleotide amplifiziert werden.

Bei der ersten Methode handelte es sich um den quantitativen Nachweis humaner männlicher DNS im Blut der weiblichen SCID-Mäuse. Der Vergleich der Menge des amplifizierten *sry*-Gens sollte Auskunft über den Beginn der Transmigration der RASF ins Blutgefäßsystem geben. Dieser Nachweis ist nicht unproblematisch, da das Gen nur in einer Kopie pro männlicher Zelle vorkommt. Zusätzlich befinden sich wahrscheinlich zu Beginn nur sehr wenige RASF im murine Blut und die Menge Blut pro Tier, die entnommen werden kann ist auf circa 1 ml limitiert. Aufgrund dieser Schwierigkeiten war der Nachweis des *sry*-Gens im Zeitverlauf nicht möglich.

Ein weiteres Verfahren beruhte auf dem Nachweis von humanen ALU-Sequenzen als Nachweis humaner Zellen im murinen Blut. Die FRAM-Familie der ALU-Sequenzen kommt im Genom von Nagern nicht vor (52 und 10) und ist deshalb in diesem Versuch humanspezifisch und kann somit zur Quantifizierung der humanen Zellen herangezogen werden (75). Die PCR zur Analyse der ALU-Sequenzen konnte bis zur Abgabe der

Dissertation etabliert werden (siehe Abb. 24). Die quantitative Analyse der DNA im Blut der Tiererrien wird derzeit durchgeführt.

Die Milz, welche neben ihren immunologischen Eigenschaften auch als Blutfilterorgan im Organismus fungiert (64, 109), stellt ein ideales Nachweisorgan für im Blut befindliche Zellen dar. Wir konnten zeigen (57), dass humane RASF, die sich im Blutkreislauf der Mäuse befinden, in der Milz nachweisbar sind (57). Der frühe Nachweis der RASF in den Milzen und damit auch im Blut der SCID-Mäuse legt die Vermutung nahe, dass die RASF auf ein Chemoattraktans aus der murinen Gefäßwand reagieren. Diese Reaktion erfolgt sehr schnell und resultiert in der Transmigration der RASF ins Blutgefäßsystem. Da die Adhäsion der RASF an den humanen bzw. bovinen Knorpel erst frühestens an Tag 18 beobachtet werden konnte, scheint das Chemoattraktans aus der murinen Gefäßwand attraktiver für einige RASF zu sein als die Knorpelmatrix. Da RASF an die ipsilateralen Knorpelmatrix adhären, dürfte eine RASF-Population aus zwei oder mehreren Subpopulationen bestehen, von denen nicht alle zur transendothelialen Migration befähigt sind (58).

#### **5.1.1.4. Adhäsion und Invasion der RASF in die Knorpelmatrix**

Die RASF-Adhäsion an den ipsilateralen Knorpel beginnt erst ab Tag 18. Diese späte Migration der RASF in Richtung auf die Knorpelmatrix wurde nicht erwartet. Wahrscheinlich resultiert diese Zeitspanne daraus, dass sich der Gradient an chemotaktisch aktiven Substanzen innerhalb des Implantates erst aufbauen musste. Die Adhäsion an die Knorpelmatrix, die über Integrin- und Catherin-Bindungen initialisiert und aufrechterhalten wird, wurde schon mehrfach beschrieben (6, 39, 57 und 76). Fast zeitgleich wurde die Invasion der RASF in den Knorpel auf der ipsilateralen Seite beobachtet. Die erhöhte Sekretion an matrixdegradierenden-Enzymen (MMPs und Cathepsine), wie sie für RASF bekannt ist (6, 39 und 76) und auch schon im SCID-Maus Modell der RA beschrieben wurde (57) war direkt nach der Adhäsion der RASF zu beobachten und führte zur Invasion der RASF in die Knorpelmatrix.

Eine erste Adhäsion von RASF an den kontralateralen Knorpel (ohne RASF implantierter Knorpel) war zwischen Tag 21 und Tag 24 in den Zeitverlauf-Experimenten zu beobachten. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich der Gradient an Chemoattraktanzien im Umfeld des Knorpels bis Tag 21 aufgebaut hat. Deshalb sollte die Migration der RASF nach Tag 21 innerhalb der Gelatinematrix sehr schnell gehen, nachdem die murine Gefäßwand auf dem Weg aus dem Blutgefäß heraus durchquert wurde. Der Faktor der die Dauer der

---

Migrationszeit bedingt scheint eher in der Expression von Adhäsionsmolekülen sowohl auf den RASF (im murinen Blut) als auch auf den Gefäßen im Umfeld des kontralateralen Implantats zu liegen.

Außerdem kann durch den Nachweis der RASF in den murinen Milzen an Tag 6 und der ersten Adhäsion an den Knorpel an Tag 24 (die während des Versuchs beobachtet werden konnte) geschlossen werden, dass RASF über einen längeren Zeitraum im Milieu des Blutes überleben können. Die Invasion der RASF in den kontralateralen Knorpel, war zwischen Tag 24 und Tag 40 zu beobachten (siehe Abb. 14 D, Anhang Abb. 49 und Abb. 50). Da die RASF erst das Blutgefäßsystem passieren mussten, war eine Differenz der Invasionszeiten zwischen ipsilateraler und kontralateraler Seite zu erwarten. Für das Verlassen des Blutgefäßsystems sind aktivierte Blutgefäße nötig, die eine erhöhte Menge an Adhäsionsmolekülen exprimieren. Dieser gefäßverändernde Reiz muss von der Knorpelmatrix ausgehen, da die RASF in der Lage sind, die Gefäße in der Nähe der Knorpelmatrix zu verlassen und nicht an „zufälligen“ Stellen in der Maus (57).

Bei Experiment 2 und 3 war schon zu Beginn eine geringe Zellinvasion zu sehen ohne dass RASF adhärirt hatten. Diese Invasion war Resultat eines teilweise bereits degradierten humanen Knorpels.

Die Migration der RASF besteht somit aus mehreren Schritten (siehe Abb. 47). Zuerst wurden verschiedene Arten von Gefäßneubildungen induziert. Dann folgte die Migration einiger RASF zur Blutgefäßwand und eine transendotheliale Migration ins Blut. Die nicht zur Transmigration befähigten RASF im ipsilateralen Knorpel migrierten zur Knorpelmatrix und invadierten diese. Die RASF im murinen Blut flossen mit dem Blutstrom, bis sie in der Lage waren an die EZ-Schicht zu binden. Die RASF konnten, nachdem sie an die EZ-Wand gebunden hatten, das Blutgefäßsystem verlassen und migrierten zur Knorpelmatrix und invadierten diese.

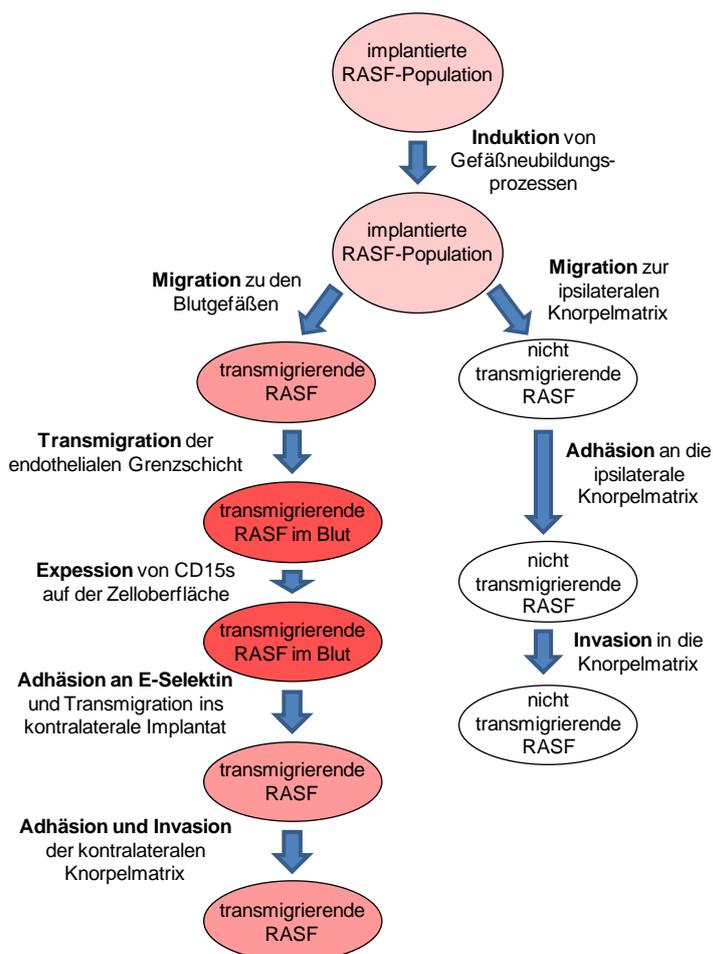


Abb. 47: Ablauf der RASF-Migration im SCID-Maus Modell.

## 5.2. RASF-Interaktion mit Endothelzellen

Die Analyse der Adhäsion der RASF an Endothelzellen zeigte interessanterweise, dass die Interaktion vom Kulturmedium und von der verwendeten EZ-Sorte abhängig war. Die Kultur mit RPMI erhöhte die Adhäsion der RASF ans Endothel im Vergleich zur Kultur mit DMEM. Die Medien unterscheiden sich in einigen Bestandteilen (siehe Tabelle 10). Das allgemein verwendete Medium für Fibroblasten ist DMEM und für die Kultur von Leukozyten wird RPMI empfohlen. Da Leukozyten aus dem Blut isoliert werden, ist davon auszugehen dass RPMI der Zusammensetzung des Blutes besser entspricht als DMEM. Welcher Faktor im Einzelnen für die erhöhte Adhäsion der RASF an die Endothelschicht verantwortlich ist, konnte im Rahmen der Arbeit bisher nicht geklärt werden, ist aber Gegenstand laufender Untersuchungen. Die Ergebnisse zeigen jedoch, wie wichtig die Wahl des richtigen Mediums

für die Analyse von *in vitro*-Versuchen ist. Außerdem könnte es bedeuten, dass der Übertritt der RASF ins Blut, welches eine ganz anderen Zusammensetzung und Konzentration an Substanzen und Zellen aufweist als das Bindegewebe, die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den RASF verändert.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis war, dass die Adhäsion an venöse EZ ausgeprägter war als an arterielle. Die vermehrte Adhäsion an venöse Endothelzellen bestätigt den Verdacht, dass von den RASF ähnliche Transmigrationswege genutzt werden, wie von den Leukozyten. Die in der Einleitung im Detail beschriebenen Leukozyten-Adhäsionskaskade (siehe 1.6.2.2.) findet ebenfalls in postkapillaren Venolen statt (36).

### 5.2.1. Transmigration der RASF *in vitro*

Die Transmigration der RASF *in vitro* sollte mit Hilfe eines Transmigrationsassays analysiert werden. Dieser Assay wurde zur Analyse des Transmigrationsverhaltens von Leukozyten entwickelt, die in der Lage sind im Gegensatz zu EZ Poren von 4  $\mu\text{m}$  zu passieren (31). RASF benötigen für eine Transmigration eine Poren-Mindestgröße von 8  $\mu\text{m}$ , diese Porengröße reicht ebenfalls für die Migration von EZ aus. Es konnte außerdem von Ando *et al.* gezeigt werden, dass EZ durch das Fehlen von fließendem Medium und den daraus resultierenden Scherstress-Reizen, wie es im Transmigrationsassay der Fall war, migrationsfreudiger sind (4). Während der Transmigrationsversuche, stellte sich heraus, dass verschiedene RASF-Population ein unterschiedliches Migrationsverhalten aufweisen, was sowohl die Migrationsgeschwindigkeit, als auch die Anzahl der migrierenden Zellen betrifft. Als Lösung für das teilweise auftretende Phänomen der endothelialen Migration wurde eine Kontrolle, die nur Endothelzellen enthielt, während der Versuche mitgeführt. Die Anzahl der Zellen in der unteren Kammer in dieser Kontrolle wurden dann von der Gesamtmenge der migrierten Zellen, von der Probe mit EZ und RASF abgezogen. Als weitere Möglichkeit, das temporäre Phänomen des Mitwanderns der EZ zu verhindern, wird momentan eine porenfreie Membran aus Kollagenfasern (Collagen inserts, Viscofan Bioengineering, Weinheim) in dem Transmigrationsassay untersucht, konnte aber bis zur Abgabe der Dissertation noch keine eindeutigen Ergebnisse liefern. In der vorliegenden Arbeit wird daher wegen der nicht eindeutigen Ergebnisse des Assays nur die Transmigration von RASF durch eine 100% konfluente HUVEC Schicht dargestellt. Während dieses Assays wurde ein eindeutiger *peak* im CASY-Cell Counter beobachtet, der zeigte, dass es sich nur um migrierte RASF in der unteren Kammer handelte. Dieser Versuch zeigte, dass RASF in der Lage sind eine bestehende EZ-Schicht zu überwinden und dass sie

vermehrt auf ein Chemoattraktans, wie eine erhöhte Konzentration an FCS, zu wandern. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Transmigration der RASF sehr viel länger dauert als die Transmigration von Monozyten. Erst nach 12 Stunden hatten 30% der RASF die EZ-Schicht passiert. Bei den Monozyten waren schon nach 15 min über 30% der Zellen transmigriert (30). Eine weitere Beobachtung war, dass die Anzahl der RASF in der unteren Kammer nach 12 Stunden bei positivem Gradienten und bei Gradienten-freien Ansatz nicht weiter zunahm. Die Prozentzahl der transmigrierten Zellen schwankte zwischen 30 und 33%. Im Gegensatz dazu war in den Ansätzen mit negativem Gradienten nur bis zu 12 Stunden eine Erhöhung der Zellzahl in der unteren Kammer zu beobachtet. Nach 14 bzw. 16 Stunden war eine Verringerung der RASF-Anzahl in der unteren Kammer festzustellen, die möglicherweise auf ein Zurückwandern der RASF in die obere Kammer zu erklären ist. Daraus kann geschlossen werden, dass, die Konzentration von 0% FCS in der unteren Kammer im Gegensatz zu 2% FCS in der oberen Kammer als Chemorepellent wirkt. Insgesamt konnte mit diesem Assay geklärt werden, dass RASF in der Lage sind eine EZ-Schicht in Richtung auf ein Chemoattraktans hin zu überwinden und dass die Transmigration sehr viel langsamer vonstatten geht als die Monozyten-Transmigration. Daraus kann man schließen, dass aktivierte RASF zwar in der Lage sind, durch eine Endothelschicht zu transmigrieren, aber sie nutzen die vorhandenen Moleküle der Leukozyten-Adhäsionskaskade nicht so effizient wie Leukozyten. Diese Tatsache ermöglicht die therapeutische Option einer Hemmung von Adhäsionsmolekülen oder Chemokinen, die an der Transmigration der Leukozyten beteiligt sind. Dadurch könnte man die langsamer ablaufende RASF-Transmigration verhindern, aber die schnellere und effektivere Leukozyten-Transmigration würde umgekehrt nicht beeinträchtigt werden.

### **5.3. Mögliche Adhäsionsmoleküle bei der Interaktion von RASF und Endothelzellen**

#### **5.3.1. Expression von CD15s**

Sialyl Lewis X (CD15s) wird im Gegensatz zu DMEM kultivierten RASF auf RPMI kultivierten RASF exprimiert (siehe Abb. 29). Die erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls CD15s könnte bei der unter 5.2. diskutierten verstärkten Adhäsion an EZ beteiligt sein. Ein möglicher Bindungspartner von CD15s ist E-Selektin (82). CD15s stellt somit ein Adhäsionsmolekül dar, das bei der Adhäsion von RASF an EZ beteiligt sein könnte und

damit für den ersten Schritt der Transmigration der RASF aus dem Blutkreislauf heraus verantwortlich sein könnte. Interessanterweise wurden vereinzelte größere Zellen im humanen Synovialgewebe mit CD15s-Antikörpern angefärbt (siehe Abb. 30). Ob es sich bei diesen Zellen um Fibroblasten handelt muss noch durch eine Doppelmarkierung belegt werden. CD15s wird von verschiedenen Zellsorten wie Monocyten, T-Zellen (90), folliculären dendritischen Zellen (101), B-lymphoiden Zelllinien (74) und von verschiedenen Tumorzelllinien (98) exprimiert. Weiterhin wurde gezeigt, dass das Vorhandensein von CD15s positiven Zellen mit einem erhöhten CRP-Wert (Entzündungs-Marker (69)) korreliert ist (siehe Abb. 31). Unter 5.2. wurde diskutiert, dass die Zusammensetzung von RPMI der Zusammensetzung von Blut ähnlicher ist als DMEM. Der Aufenthalt im Blutstrom könnte daneben zu einer weiteren Steigerung der Expression von CD15s auf RASF führen. Wenn sich herausstellt, dass es sich bei den CD15s positiven Zellen im Synovialgewebe um RASF handelt, könnte das darauf hindeuten, dass die RASF-Migration und Transmigration aus dem Blutkreislauf heraus mit einer Entzündung oder der Erhöhung von Entzündungsparametern assoziiert ist.

### 5.3.2. Funktion von E- und P-Selektin

Um zu testen ob die RASF-Transmigration aus dem Blutgefäßsystem heraus durch Selektinbindungen initialisiert wird, wurde die Bindungsfähigkeit der RASF an E- und P-Selektin *in vitro* mit Hilfe des Flusskammerversuchs analysiert (siehe 3.8.3.). Gleichzeitig sollte eine Bindungsfähigkeit von OASF unter den gleichen Bedingungen untersucht werden, um mögliche Unterschiede zwischen RASF und OASF beim Verlassen des Blutgefäßsystems nachzuweisen, die das Vorhandensein der Transmigrationsfähigkeit bei den RASF und die Ortsständigkeit der OASF erklärt. Nach einer anfänglich sehr ernüchternden Feststellung, dass weder RASF noch OASF während jeglicher gewählter Fließgeschwindigkeit an E- oder P-Selektin binden wollten, wurde das Kulturmedium von DMEM auf RPMI umgestellt. Daraufhin zeigte sich eine gut differenzierbare stärkere Adhäsion der RASF an E-Selektin im Vergleich zu den OASF.

Wie man in Abb. 34 und 35 erkennt, waren RASF bei jeder gewählten Scherkraft am E-Selektin beschichteten Boden adhärenter als OASF. Bei P-Selektin konnten keine adhären SF beobachtet werden. Von der Leukozyten-Adhäsionskaskade weiss man, dass die erste Rekrutierung und Bindung der Leukozyten an die Endothelzellen durch Selektine vermittelt wird (siehe 1.6.2.2.). Die erhöhte Expression von CD15s auf mit RPMI kultivierten RASF (siehe Abb. 29) und die verstärkte Adhäsion von RASF an E-Selektin, die

auch erst nach einer Kultur mit RPMI beobachtet werden konnte, deutet darauf hin, dass die Bindung von CD15s und E-Selektin den ersten Schritt der Rekrutierung der RASF aus dem Blut steuert. Eine Hemmung des RASF gebundenen CD15s könnte die RASF Adhäsion verringern.

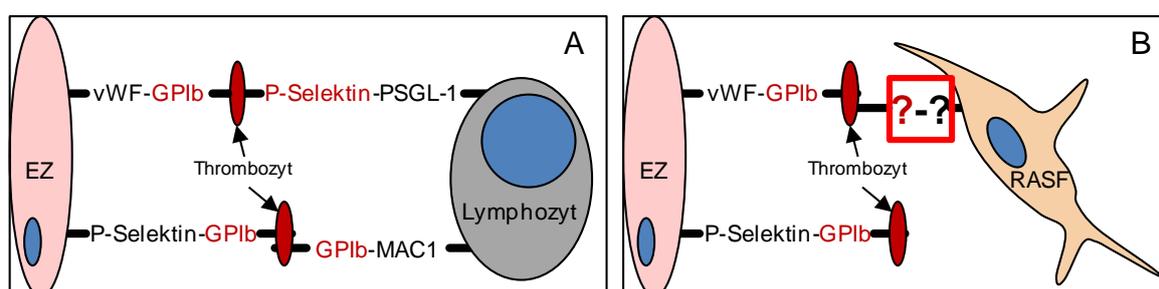
In dem ersten *in vivo*-Experiment wurde daher die Invasion der RASF zwischen E- und P-exprimierenden Mäusen mit der von E- und P- Selektin-defizienten Mäusen im SCID-Maus Modell nach 60 Tag verglichen. Die E- und P-Selektin-defizienten SCIDs zeigten ipsilateral eine sichtbare Reduktion der Invasion aber auf der kontralateralen Seite waren nur marginale Unterschiede zwischen den Gruppen zu sehen. Die Verkürzung der Versuchszeit auf 45 Tage führte zu einer signifikanten Reduktion der Invasion auf der kontralateralen Seite und zu einer marginalen Erhöhung der Invasion auf der ipsilateralen Seite, die bezüglich des Gesamtergebnisses vernachlässigbar gering war. Eine mögliche Erklärung für die Angleichung der Invasionswerte nach 60 Tagen in den kontralateralen Implantaten der E-/P-Selektin-defizienten Mäusen an die Kontrollgruppe ist, dass es sich um einen zu späten Analysezeitpunkt handelt. Dabei wird die Adhäsion der RASF an E-Selektin über den lange Zeitraum durch andere Adhäsionsmoleküle kompensiert. Das Ergebnis passt zu den bisherigen Annahmen, dass E-Selektin als Bindungspartner von CD15s bei der Transmigration der RASF aus dem Blutgefäßsystem beteiligt ist. Der 60 Tage dauernde *in vivo*-Versuch zeigt dagegen, dass RASF über kompensatorische Mechanismen verfügen, die sie dazu befähigen andere Adhäsionsmoleküle für die erste Bindung ans Endothel zu nutzen. Es ist daher geplant, die später in die Leukozyten-Adhäsionskaskade eingreifenden Integrine auf ihre Beteiligung an der Transmigration der RASF zu untersuchen.

#### **5.4. Interaktion der RASF mit Thrombozyten**

Da Thrombozyten über verschiedene Adhäsionsmoleküle verfügen, können sie die Adhäsion der im Blut-befindlichen Zellen verstärken oder mangelnde Adhäsion, resultierend aus einer reduzierten Expression eines Bindungspartners, kompensieren. Unter 4.5. wurden kryokonservierte Implantatschnitte und Zytospins auf die Expression des Blutplättchen-assoziierten Moleküls Glykoprotein Ib (GPIb) hin untersucht. GPIb liegt als Teil eines größeren Proteinkomplexes vor und hat sowohl eine Bindestelle für den von Willebrandfaktor (vWF) als auch für E-Selektin (17). Blutplättchen können somit über verschiedene Adhäsionsmoleküle (z.B. GPIb $\alpha$  an den endothelialen vWF) an aktivierte Endothelzellen binden, die von den Leukozyten oder auch RASF nicht zur Adhäsion verwendet werden

können. Auf der anderen Seite können Blutplättchen über P-Selektin an PSGL-1 oder über GPIIb/IIIa an MAC 1 an Leukozyten binden und so die Leukozytenadhäsion vermitteln oder verstärken (67, 78 und 106).

Die immunhistologische Färbung zeigte ein intensives EZ-assoziiertes Signal sowie kleine granuläre Signale im Blut-Lumen bei einem ipsilateralen Implantat an Tag 3 nach der Operation (siehe Abb. 37 A). Die Färbung der Innenseite der Gefäßwand könnte hierbei auf eine vermehrte Bindung von Blutplättchen an aktiviertes Endothel, wie unter (17) beschrieben, zurückzuführen sein. Bei den kleinen granulären Strukturen handelt es sich wahrscheinlich um Blutplättchen im murinen Blut. In einem anderen Implantat, das 9 Tage nach der Operation entnommen wurde, konnte eine einzelne größere Zelle außerhalb der Gefäße aber innerhalb der Gelatinematrix beobachtet werden (siehe Abb. 37 B). Das zeigt, dass Blutplättchen an Zellen im Blut binden und von den Zellen mit ins Gewebe transportiert werden können. Die immunzytologischen Färbungen (gegen CD42b) eines Zytospins mit Blutzellen zeigen, dass die Thrombozyten im Blut an größere Zellen binden (siehe Abb. 38). Aber die Tatsache, dass von einigen Zellen nur die Zellkerne zu erkennen waren, verdeutlicht, dass die Thrombozyten nicht an alle kernhaltigen Zellen binden. Das Ergebnis des Schüttelversuchs (siehe 4.4.1.2.) wurde bisher nur auf die Expression von CD15s untersucht. Die Analyse einer Bindung von RASF an Thrombozyten soll in diesem Versuch zukünftig ebenfalls durchgeführt werden (siehe Abb. 48). Welche Zellen mit Blutplättchen interagieren und ob es sich dabei um RASF handelt, soll durch weiterführende Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen, der Zytospins des Blutes geklärt werden. Die Bindung von RASF an Thrombozyten stellt eine weitere Möglichkeit für die transendotheliale Migration aus dem Blutkreislauf am kontralateralen Implantat dar.



**Abb. 48: Vergleich der Lymphozyten-Thrombozyten-Interaktion (A) mit einer RASF Thrombozyten-Interaktion (B) zur Verstärkung der RASF-Adhäsion in Gefäßen am kontralateralen Implantat.**

## 5.5. Wirkung von RNase/DNase sowie exRNS/exDNS auf RASF

*In vitro* konnte die Expression von RNase und extrazellulärer RNS durch RASF gezeigt werden, wobei SF anderer Herkunft, ähnliche Mengen produzierten (siehe Abb. 39 und Abb. 40). Die Analyse des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 im Überstand von unterschiedlich stimulierten RASF zeigte, dass Nucleasen die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine reduzieren, die durch die Sekretion autologer Faktoren induziert werden (siehe Abb. 41). Diese Reaktion wurde auch gegenläufig untersucht und es zeigte sich, dass autologe exDNS sowie exRNS, die IL-6 Sekretion ins Medium konzentrationsabhängig steigern (siehe Abb. 42). Daraus kann geschlossen werden, dass exDNS bzw. exRNS eine pro-inflammatorische Wirkung auf RASF hat, die durch Nucleasen reduziert werden kann.

*In vivo* konnte gezeigt werden, dass nach 60 Tagen eine geringe Reduktion der Invasion auf der ipsilateralen Seite durch die Behandlung mit RNase erzielt wurde (siehe Abb. 43). Auf der kontralateralen Seite war eine leichte Reduktion der Invasion durch DNase erzielt worden. Beide Reduktionen waren nicht statistisch signifikant. Um auch in diesem Fall einen zu späten Analysezeitpunkt auszuschließen, bei dem die anti-inflammatorische Wirkung der Nucleasen durch andere Moleküle kompensiert wird, wurde das Experiment wiederholt und der Zeitraum auf 45 Tage reduziert. Nach 45 Tagen konnte eine deutliche Reduktion der Invasion auf der ipsilateralen Seite durch beide Nucleasen beobachtet werden. Die kontralaterale Seite zeigte keine Unterschiede im Invasionswert. Daraus kann geschlossen werden, dass Nucleasen eine invasionshemmende Wirkung auf RASF haben, indem entzündungsfördernde exRNS und exDNS abgebaut werden. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass RASF Rezeptoren besitzen, die extrazelluläre Nukleinsäuren binden können und durch die Bindung ein intrazelluläres Signal ausgelöst wird. Der Nachweis dieser Rezeptoren wurde wie oben angegeben beschrieben, und es konnte auch gezeigt werden, dass durch mikroRNS Angiogenese induziert werden (27) und eine TLR 3 vermittelte Bindung von Poly (I:C) an RASF in einer vermehrten Expression von VEGF und IL-8 resultieren kann (71). Diese Daten zeigen, dass die Bindung von Nukleinsäuren an RASF nicht nur eine pro-inflammatorische sondern auch eine angiogene Wirkung hat und die Unterdrückung dieser Wirkung auch die Gefäßneubildung hemmen könnte. Extrazelluläre Nukleotide könnten eine weitere Ebene der Zell-Zell-Interaktion darstellen, die bis jetzt noch nicht ausreichend untersucht wurde. RNase oder DNase könnte daher zumindest theoretisch einen Therapieansatz zur Unterdrückung der RASF-vermittelten Gelenkerosion darstellen. Bis jetzt wurde nur mittels Onkonase eine Wirkung einer RNase beobachtet. (6). Die Wirkung der im SCID-Maus Modell eingesetzten RNase und DNase beruht dabei nicht wie bei der

Onkonase auf einer zytotoxischen Wirkung des Moleküls sondern darauf, dass außerhalb der Zelle die pro-inflammatorisch wirkenden Nukleinsäuren abgebaut werden.

## 5.6. Hemmung der Transmigration

Durch die Behandlung der SCID-Mäuse mit verschiedenen DMARDs, Biologika und anderen Inhibitoren sollte der Effekt der Substanzen auf die Transmigration und Invasion der RASF untersucht werden. Die Glukokortikoide zeigten hierbei eine deutliche reduzierende Wirkung auf die Invasion der RASF in den ipsilateralen Knorpel (siehe Abb. 45). Die anti-rheumatische Wirkung der Glukokortikoide wird schon seit dem ersten Einsatz durch den Nobelpreisträgers Philip Hench (1948) in der Behandlung rheumatischer Erkrankungen genutzt. Jetzt konnte gezeigt werden, dass neben der entzündungs-hemmenden und immunsuppressiven Wirkung auch eine Invasions-reduzierende Wirkung auf die RASF induziert wird.

Unter Tabelle 25. sind die getesteten Biologika und der Protease-Inhibitor dargestellt. Es zeigte sich, dass Anakinra, Tocilizumab, und Bortezomib keinen Effekt auf die Transmigration der RASF haben. Anakinra und Tocilizumab wirken in der RA somit scheinbar nur auf die an der RA beteiligten Leukozyten. Bortezomib, das in der Onkologie als Proteasom-Hemmer besonders auf maligne veränderte Zellen wirkt (107), zeigte im SCID-Maus Modell auf die Fibroblasten keine Wirkung. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Moleküle IL-1 und IL-6 sowie eine Proteasom-abhängige Expression von Adhäsionsmolekülen das Transmigrations- und Invasions-Verhalten der RASF nicht beeinflussen. Aus verschiedenen Publikationen war ersichtlich, dass die verwendeten Biologika und der Proteasom-Hemmer nicht nur mit ihren humanen Bindungspartnern assoziieren sondern auch mit den murinen Molekülen kreuzreaktiv sind (69, 99 und 107). Interessanterweise war nur bei Bevacizumab eine Transmigrations-hemmende Wirkung zu beobachten (siehe Abb. 46). Die Hemmung der Gefäßneubildung scheint einen deutlichen Effekt auf die Migration der RASF zu haben. Dieses Ergebnis passt in dem Kontext und unterstreicht die Bedeutung der unter 4.1.2. beobachteten Gefäßneubildung zu sehr frühen Zeitpunkten, welche eine notwendige Voraussetzung für die transendotheliale RASF-Migration zu sein scheint. Auch in der Literatur werden schon seit längerem die positiven Einflüsse der Angiogenese-Hemmer diskutiert (53 und 105), doch diese Eigenschaft wurde bis jetzt noch nicht in einen Zusammenhang mit der RASF-Migration gestellt.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Dissertation wurden Mechanismen zur transendothelialen Migration der synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RASf) charakterisiert. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Interaktion der RASf mit Endothelzellen (EZ). Hierfür wurden verschiedene zellbiologische und molekularbiologische Methoden sowie funktionelle Testsysteme etabliert. Dies beinhaltete ebenfalls die Isolation und Charakterisierung von humanen EZ aus verschiedenen Gefäßarealen. Außerdem wurde das SCID-Maus Modell den Fragestellungen entsprechend angepasst und eingesetzt. Die Methoden wurden zur Analyse der Kinetik und der Mechanismen der transendothelialen RASf-Migration verwendet, um mögliche Ansatzstellen für neue Behandlungsmethoden der RA aufzeigen.

Der Ablauf der transendothelialen RASf-Migration konnte in verschiedene Phasen eingeteilt werden. Diese bestehen aus einer sehr frühen Induktion der Gefäßneubildung, einer transendothelialen Migration der RASf und einer Adhäsion an die Knorpelmatrix mit sofort beginnender Invasion. Die erste Phase und die damit einhergehende Gefäßpermeabilität sind essentiell für die sehr frühe Migration der RASf. Diese frühe Migration der RASf wurde durch den Nachweis von humanen Zellen in den murinen Milzen belegt. So stellte die Hemmung der RASf-vermittelten Gefäßinduktion eine sehr effektive Methode dar, die transendotheliale Migration der RASf zu reduzieren. Die durch RASf induzierte Gefäßneubildung konnte durch Bevacizumab effektiv gehemmt werden, da die Hemmung von VEGF alle drei möglichen Neovaskularisierungsarten im SCID-Maus Modell verringerte.

Weiterhin konnte auf den RASf eine mediumabhängige Expression des E-Selektin Liganden CD15s nach der Kultur mit RPMI immunhistochemisch nachgewiesen werden. In funktionellen Versuchen *in vitro* konnte gezeigt werden, dass die Kultur der RASf mit RPMI eine deutliche Adhäsionsverstärkung zur Folge hat. Außerdem stellte sich bei immunhistochemischen Analysen des Synovialgewebes von Patienten mit RA heraus, dass die Präsenz von CD15s mit einem erhöhten CRP-Gehalt der Patienten einhergeht. Der E-Selektin abhängige Mechanismus der endothelialen RASf-Migration konnte *in vivo* durch Verwendung von E- und P-Selektin-defizienten SCID-Mäusen belegt werden. Dabei wurde dieser Effekt aber längerfristig kompensiert. *In vitro* war ebenfalls eine verstärkte Adhäsion der RASf an E-Selektin zu beobachten. Im Gegensatz dazu, hatte P-Selektin *in vitro* als Adhäsionsmolekül keine Bedeutung bei der Bindung der RASf oder OASF.

Bei den Analysen zur Adhäsion von RASf an das Endothel stellte sich heraus, dass RASf ähnliche Mechanismen wie Leukozyten verwenden. So scheinen RASf mit Thrombozyten zu

assoziiieren. Im SCID-Maus Modell liegt das Adhäsionsmolekül CD42b am Endothel der Implantate vor und könnte somit bei der Adhäsion der RASF an das Endothel von Bedeutung sein.

Die Applikation von RNase reduzierte *in vitro* die IL-6-Sekretion durch RASF sowie als therapeutischer Ansatz *in vivo* die RASF-Invasion. Interessanterweise wiesen exDNase als auch exRNase einen reduzierenden Effekt auf die Invasion der RASF im ipsilateralen Implantat auf. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Methotrexat und Kortikosteroide die Invasion der RASF in den koimplantierten, ipsilateralen Knorpel reduzieren, aber keinen Effekt auf die transendotheliale Migration der RASF haben. Bei den Biologika wies nur Bevacizumab einen reduzierenden Effekt auf die transendotheliale RASF-Migration auf, wohingegen weder Anakinra, Tocilizumab oder der Proteasom-Inhibitor Bortezomib einen Effekt aufzeigten.

Zusammenfassend lassen sich als zentrale Ergebnisse folgende Aussagen treffen:

- 1.) Die transendotheliale Migration der RASF läuft in mehreren Phasen ab, die schon früh nach der Implantation beginnen.
- 2.) Die Interaktion mit Endothelzellen über Adhäsionsmoleküle ist eine zentrale Voraussetzung für die transendotheliale Migration der RASF.
- 3.) Thrombozyten sowie extrazelluläre RNS und DNS beeinflussen die Migration und Invasion von RASF.
- 4.) Die Wirkung von immunsuppressiven Antirheumatika könnte zum Teil auf deren Effekt auf die Migration der RASF beruhen.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Hemmung der sehr früh beginnenden transendothelialen RASF-Migration einen neuen therapeutischen Ansatz darstellt, der die Ausbreitung der Gelenkerosion bei RA-Patienten auf nichterodierte Gelenke verringern könnte.

## 7. SUMMARY

### **Characterization of the transendothelial migration of synovial fibroblasts in the rheumatoid arthritis**

This dissertation characterized the mechanisms of transendothelial migration of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis (RASf) and focused on the interaction of RASf with endothelial cells (EC). Different methods of cell biology and molecular biology as well as functional assays were established, such as the isolation and characterization of EC from different vascular areas. In addition, the SCID-mouse model of RA was adapted to the questions to be studied, specifically the analysis of the kinetics and the mechanisms of the transendothelial RASf migration and the discovery of new treatments approaches in RA.

The process of transendothelial RASf migration could be classified into different steps. The first step was the induction of vascularization which was induced very early. Then, transendothelial migration and adhesion followed. Finally, invasion into the cartilage matrix was visible. The first step of early neovascularization and the increased vascular permeability resulting from this were essential for the RASf migration. The early migration of RASf was confirmed by immunohistochemical detection of human cells in the murine spleen. Inhibition of RASf mediated vessel formation was an effective method to reduce the migration of RASf. Bevacizumab, a VEGF inhibitor, could be established as a migration inhibitor possibly because of its potential to reduce the three modes of neovascularization visible within the SCID-mouse model.

Furthermore, RPMI media-dependent expression of the E-selectin ligand CD15s could be demonstrated immunohistochemically. Stronger adhesion was visible in functional *in vitro* assays after substituting RPMI for DMEM in RASf cultures. In addition, the presence of CD15s in the synovial tissue of patients with RA was correlated with an increased CRP concentration in the blood serum. The role of E-selectin in endothelial RASf migration could be demonstrated *in vivo* using E- and P-selectin-deficient SCID-mice. However, in the long term this effect was compensated. *In vitro*, a stronger adhesion of RASf to E-selectin was visible but P-selectin did not affect binding of RASf or OASF.

In analyses of RASF adhesion it could be shown, that these cells use similar mechanisms as leukocytes for the adhesion to the endothelium. In that context it seems possible that RASF interact with platelets. In the SCID-mouse model, CD42b is present within the endothelium of the implants. Therefore, this mechanism might also be used by RASF.

Application of RNase *in vitro* decreased the IL-6 secretion by RASF and resulted in a reduced RASF invasion into the cartilage in an therapeutic approach *in vivo*. Interestingly, exDNase as well as exRNase showed an inhibitory effect on the invasion of RASF into the ipsilateral implant. Furthermore, it could be demonstrated that methotrexate and corticosteroids reduced the invasion of RASF into the coimplanted ipsilateral cartilage *in vivo* but they had no effect on the transendothelial RASF migration. From the biologics used only Bevacizumab showed an inhibitory effect on the transendothelial RASF migration whereas neither Anakinra nor Tocilizumab or the proteasome inhibitor Bortezomib showed any effect.

In summary the main results led to the following findings:

- 1.) The transendothelial RASF migration takes place in several steps which start very early after implantation.
- 2.) The interaction of endothelial cells via adhesion molecules is a central requirement for the endothelial transmigration of RASF.
- 3.) Platelets and extracellular RNA and DNA affect the migration and invasion of RASF.
- 4.) The outcome of immunosuppressive anti-rheumatic drugs may partially be due to their effect on RASF migration.

In conclusion, the inhibition of the very early transendothelial RASF migration could represent a new therapeutic approach, which could reduce the spreading of the articular erosion to non-affected joints in RA patients.

## 8. ABKÜRZUNGEN

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
Abb.	Abbildung
AEC	Aminoethylcarbazol
AECA	<i>Antiendothelial Cell Antibodies</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSM	Basalmembran
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Calcein-AM	Calcein- Acetoxymethylester
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CRP	<i>C-reaktives Protein</i>
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
dl	Deziliter
DMARD	<i>disease-modifying anti-rheumatic drug</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	desoxyribonucleinsäureabbauendes Enzym
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsRNS	doppelsträngige Ribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ECGS	<i>Endothelial Cell Growing Supplement</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
EPC	<i>Endothelial Progenitor Cell</i>
ERM-Proteine	Ezrin, Radizin und Moesin, sind drei Proteine die Actin-Filamente mit der Plasmamembran verbinden
ESAM	Endothelzell spezifisches Adhäsionsmolekül
exDNS	extrazelluläre Desoxyribonucleinsäure
exRNS	extrazelluläre Ribonucleinsäure
EZ	Endothelzellen
FcR $\gamma$	<i>Constant Fragment Receptor <math>\gamma</math></i>
FCS	Fetal Calf Serum
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
FLS	<i>fibroblast like synoviocyte</i>
FSAP	Faktor VII-aktivierende Protease
g	Gramm

---

GPIb	Glykoprotein Ib
h	Stunden
HAE	humane arterielle Endothelzellen
H / E-Färbung	Hämalaun / Eosin-Färbung
HIF	Hypoxia-inducible factor
HUVEC	<i>Endothelial Cells from the umbilical vein</i>
HVE	humane venöse Endothelzellen
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecules</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JAM-A	<i>Junctional Adhesion Molecule A</i>
kg	Kilogramm
LFA1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LG	Lebendgewicht
LPS	Lipopolysaccharide
MAC1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MADCAM	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteasen
MNAB	membranassoziertes nukleinsäurebindendes Protein
mV	Millivolt
NaCl	physiologische Kochsalzlösung
NF $\kappa$ B	Nuclearer Faktor ‚kappa-leichte-Kette-Verstärker‘ von aktivierten B-Zellen
NFS	synoviale Fibroblasten von gesunden Probanden
NOS	Stickstoffoxid-Synthase
OA	Osteoarthritis
OASF	synovialer Fibroblast vom Patienten mit Osteoarthritis
OT	Objektträger
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PECAM1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1</i>

---

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
Poly(I:C)	<i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PsA-SF	Psoriasisarthritis
PSGL1	P-Selektin Glykoprotein Ligand 1
RA	rheumatoide Arthritis
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-<math>\kappa</math>B Ligand</i>
RASF	synovialer Fibroblast vom Patienten mit rheumatoider Arthritis
RNase	ribonucleinsäureabbauendes Enzym
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	RPMI-Medium
RT	Raumtemperatur
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>
SEM	Standard Error of the Mean, (Standardfehler des Mittelwertes)
SF	synovialer Fibroblast
SRC Kinasen	<i>Sarcoma Kinases</i>
sry	<i>Sex determining region of Y</i>
STABW	Standartabweichung
Tab.	Tabelle
TEER- Assay	<i>Trans Epithelial Electric Resistance Assay</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>
TLR	<i>Toll-like Rezeptoren</i>
TNFR2	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 2
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
U	<i>Unit</i>
UV-Licht	ultraviolettes Licht
VAVs	Guanosintriphosphat-Austauschfaktoren
VE-Catherin	<i>Vascular Endothelial Catherin</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR2	VEGF Rezeptor 2
Verd.	Verdünnung
VLA	<i>Very Late antigen</i>
vWF	von Willebrand Faktor
w/v	<i>weight per volume</i>
x g	Zentrifugalbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter

---

## 9. REFERENZEN

1. Aicher WK, Pap T, Gay S: Laminin-modulierte Entzündungsreaktionen in synovialen Fibroblasten von Rheumapatienten. *Z Rheumatol.* 2008 Feb; 67(1):59-61.
2. Aller MA, Arias JL, Cruz A, Arias J: Inflammation: a way to understanding the evolution of portal hypertension. *Theor Biol Med Model.* 2007 Nov 13;4:44.
3. Altincicek B, Shibamiya A, Trusheim H, Tzima E, Niepmann M, Linder D, Preissner KT, Kanse SM: A positively charged cluster in the epidermal growth factor-like domain of Factor VII-activating protease (FSAP) is essential for polyanion binding. *Biochem J.* 2006 Mar 15;394(Pt 3):687-92.
4. Ando J, Yamamoto K: Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress. *Circ J.* 2009 Nov;73(11):1983-92.
5. André V, le Goff B, Leux C, Pot-Vaucel M, Maugars Y, Berthelot JM: Information on glucocorticoid therapy in the main studies of biological agents. *Joint Bone Spine.* 2011 Feb 18.
6. Ardelt W, Ardelt B, Darzynkiewicz Z: Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy. *Eur J Pharmacol.* 2009 Dec 25;625(1-3):181-9.
7. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31:315-324.
8. Bailey AM, Lawrence MB, Shang H, Katz AJ, Peirce SM: Agent-based model of therapeutic adipose-derived stromal cell trafficking during ischemia predicts ability to roll on P-selectin. *PLoS Comput Biol.* 2009 Feb;5(2):e1000294.
9. Bartok B, Firestein GS: Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2010 Jan; 233(1):233-55.
10. Batzer MA, Deininger PL: Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet.* 2002 May;3(5):370-9.
11. Brinkmann V, Zychlinsky A: Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Aug;5(8):577-82.

12. Buckley CD, Filer A, Haworth O, Parsonage G, Salmon M: Defining a role for fibroblasts in the persistence of chronic inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis.* 2004 Nov;63 Suppl 2:ii92-ii95.
13. Buschmann IR, Hoefler IE, van Royen N, Katzer E, Braun-Dulleus R, Heil M, Kostin S, Bode C, Schaper W: GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis.* 2001 Dec;159(2):343-56.
14. Cai WJ, Kocsis E, Wu X, Rodríguez M, Luo X, Schaper W, Schaper J: Remodeling of the vascular tunica media is essential for development of collateral vessels in the canine heart. *Mol Cell Biochem.* 2004 Sep;264(1-2):201-10.
15. Chen X, Oppenheim JJ, Howard OM: Chemokines and chemokine receptors as novel therapeutic targets in rheumatoid arthritis (RA): inhibitory effects of traditional Chinese medicinal components. *Cell Mol Immunol.* 2004 Oct;1(5):336-42.
16. Cheung LS, Raman PS, Balzer EM, Wirtz D, Konstantopoulos K: Biophysics of selectin-ligand interactions in inflammation and cancer. *Phys Biol.* 2011 Feb;8(1):015013.
17. Clemetson K: A short history of platelet glycoprotein Ib complex. *Thromb Haemost.* 2007 Jul;98(1):63-8.
18. Cole TJ: Glucocorticoid action and the development of selective glucocorticoid receptor ligands. *Biotechnol Annu Rev.* 2006;12:269-300.
19. Cryer B, Luo X, Assaf AR, Sands G, Mardekian J. Persistence with non-selective NSAIDs and celecoxib among patients with gastroesophageal reflux disease and osteoarthritis or rheumatoid arthritis. *Curr Med Res Opin.* 2011 Feb;27(2):295-302.
20. del Rey MJ, Izquierdo E, Caja S, Usategui A, Santiago B, Galindo M, Pablos JL: Human inflammatory synovial fibroblasts induce enhanced myeloid cell recruitment and angiogenesis through a hypoxia-inducible transcription factor 1alpha/vascular endothelial growth factor-mediated pathway in immunodeficient mice. *Arthritis Rheum.* 2009 Oct;60(10):2926-34.
21. Devine EB, Alfonso-Cristancho R, Sullivan SD: Effectiveness of biologic therapies for rheumatoid arthritis: an indirect comparisons approach. *Pharmacotherapy.* 2011 Jan;31(1):39-51.

- 
22. Fearon U, Griosios K, Fraser A, Reece R, Emery P, Jones PF, Veale DJ: Angiopoietins, growth factors, and vascular morphology in early arthritis. *J Rheumatol.* 2003 Feb;30(2):260-8.
  23. Fearon U, Veale DJ: Pathogenesis of psoriatic arthritis. *Clin Exp Dermatol.* 2001 Jun;26(4):333-73
  24. Fischer S, Gerriets T, Wessels C, Walberer M, Kostin S, Stolz E, Zheleva K, Hocke A, Hippenstiel S, Preissner KT: Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood.* 2007 Oct 1;110(7):2457-65.
  25. Fischer S, Nishio M, Dadkhahi S, Gansler J, Saffarzadeh M, Shibamiyama A, Kral N, Baal N, Koyama T, Deindl E, Preissner KT: Expression and localisation of vascular ribonucleases in endothelial cells. *Thromb Haemost.* 2011 Feb 1;105(2):345-55.
  26. Fischer S, Nishio M, Peters SC, Tschernatsch M, Walberer M, Weidemann S, Heidenreich R, Couraud PO, Weksler BB, Romero IA, Gerriets T, Preissner KT: Signaling mechanism of extracellular RNA in endothelial cells. *FASEB J.* 2009 Jul;23(7):2100-9.
  27. Fraisl P, Mazzone M, Schmidt T, Carmeliet P: Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev Cell.* 2009 Feb;16(2):167-79.
  28. Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, Tanii M, Nakano T, Egashira K, Takehara T, Inoue M, Hasegawa M, Kuwano H, Sueishi K: Nonendothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Nov;26(11):2483-9.
  29. Galesić K, Prkacin I, Tisljar M, Vergles JM: Renal involvement in patients with rheumatoid arthritis. *Reumatizam.* 2009;56(1):30-5.
  30. Goldring SR: Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2003 May; 42 Suppl 2:ii11-6.
  31. Greening JE, Tree TI, Kotowicz KT, van Halteren AG, Roep BO, Klein NJ, Peakman M: Processing and presentation of the islet autoantigen GAD by vascular endothelial cells promotes transmigration of autoreactive T-cells. *Diabetes.* 2003 Mar;52(3):717-25.

32. Guennoc X, Narbonne V, Jousse-Joulin S, Devauchelle-Pensec V, Dougados M, Daurès JP, Saraux A: Is Screening for Hepatitis B and Hepatitis C Useful in Patients with Recent-Onset Polyarthritis? The ESPOIR Cohort Study. *J Rheumatol*. 2009 Jul;36(7):1407-13.
33. Hajizadeh S, DeGroot J, TeKoppele JM, Tarkowski A, Collins LV: Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(5):R234-40.
34. Haller C, Kübler W: [Cell polarity in the cardiovascular system]. *Z Kardiol*. 1999 May;88(5):324-30.
35. Harris ED: *Rheumatoid Arthritis*. W. B. Saunders Company. 1997.
36. He P: Leucocyte/endothelium interactions and microvessel permeability: coupled or uncoupled? *Cardiovasc Res*. 2010 Jul 15;87(2):281-90.
37. Hellmich B, Merkel F, Weber M, Gross WL: [Early diagnosis of chronic systemic inflammatory disorders]. *Internist (Berl)*. 2005 Apr;46(4):421-32.
38. Hristov M, Erl W, Weber PC: Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med*. 2003 Jul;13(5):201-6.
39. Huber LC, Distler O, Tarner I, Gay RE, Gay S, Pap T: Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006 Jun; 45(6):669-75.
40. Hunter DJ, Felson DT: Osteoarthritis. *BMJ*. 2006 Mar 18;332(7542):639-42.
41. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W: Monocyte chemoattractant protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res*. 1997 Jun;80(6):829-37.
42. Jiang WG, Harding KG: Enhancement of wound tissue expansion and angiogenesis by matrix-embedded fibroblast (dermagraft), a role of hepatocyte growth factor/scatter factor. *Int J Mol Med*. 1998 Aug;2(2):203-210.
43. Judex M, Neumann E, Fleck M, Pap T, Mountz JD, Gay RE, Schölmerich J, Nishioka K, Gay S, Müller-Ladner U. "Inverse wrap" - an improved implantation technique for virus transduced synovial fibroblasts in the SCID-mouse model for RA. *Mod Rheumatol* 2001; 11: 145-150
44. Kaiser H: A. J: Landré-Beauvais (1772–1840) – der wirkliche Erstbeschreiber der rheumatoiden Arthritis. *Z Rheumatol* 2004; 63:430–435.

- 
45. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, Song Y, Tzima E, Kennerknecht E, Niepmann M, von Bruehl ML, Sedding D, Massberg S, Günther A, Engelmann B, Preissner KT: Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 10;104(15):6388-93.
  46. Karouzakis E, Neidhart M, Gay RE, Gay S: Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol Lett*. 2006 Jul 15; 106(1):8-13.
  47. Kaysen GA: Biochemistry and biomarkers of inflamed patients: why look, what to assess. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 Dec;4 Suppl 1:S56-63.
  48. Khalil AA, Friedl P: Determinants of leader cells in collective cell migration. *Integr Biol (Camb)*. 2010 Nov 2;2(11-12):568-74.
  49. Klarenbeek NB, Kerstens PJ, Huizinga TW, Dijkmans BA, Allaart CF: Recent advances in the management of rheumatoid arthritis. *BMJ*. 2010 Dec 21;341:c6942.
  50. Köhler S, Ullrich S, Richter U, Schumacher U: E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *Br J Cancer*. 2010 Feb 2;102(3):602-9.
  51. Kostyuk SV, Smirnova TD, Efremova LV, Konkova MS, Alekseeva AY, Kameneva LV, Veiko NN: Enhanced expression of iNOS in human endothelial cells during long-term culturing with extracellular DNA fragments. *Bull Exp Biol Med*. 2010 Aug;149(2):191-5.
  52. Kriegs JO, Churakov G, Jurka J, Brosius J, Schmitz J: Evolutionary history of 7SL RNA-derived SINEs in Supraprimates. *Trends Genet*. 2007 Apr;23(4):158-61.
  53. Lainer-Carr D, Brahn E: Angiogenesis inhibition as a therapeutic approach for inflammatory synovitis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007 Aug;3(8):434-42.
  54. Lebherz C, von Degenfeld G, Karl A, Pfosser A, Raake P, Pachmayr F, Scholz D, Kupatt C, Boekstegers P: Therapeutic angiogenesis/arteriogenesis in the chronic ischemic rabbit hindlimb: effect of venous basic fibroblast growth factor retroinfusion. *Endothelium*. 2003;10(4-5):257-65.

- 
- 55 Lee EG, Lee SL, Chae HJ, Park SJ, Lee YC, Yoo WH: Ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* inhibits IL-1 $\beta$ -induced rheumatoid synovial fibroblast proliferation and MMPs, COX-2 and PGE2 production. *Biol Res.* 2010;43(2):225-31.
- 56 Lee SU, Wykrzykowska JJ, Laham RJ: Angiogenesis: bench to bedside, have we learned anything? *Toxicol Pathol.* 2006;34(1):3-10.
- 57 Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnäker EM, Turner IH, Robbins PD, Evans CH, Stürz H, Steinmeyer J, Gay S, Schölmerich J, Pap T, Müller-Ladner U, Neumann E: Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med.* 2009 Dec; 15(12):1414-20.
- 58 Lefèvre S, Zimmermann B, Benninghoff S, Lehr A, Stürz H, Steinmeier J, Rehart S, Müller-Ladner U, Neumann E: Migration von Subpopulationen primärer synovialer Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis. *Z Rheum* 2009; 68 (Suppl 1)
- 59 Leonhardt H: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen; Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie-Band 3; 8. überarbeitete und erweiterte Auflage; Thieme Verlag (1990)
- 60 Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S: Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007 Sep;7(9):678-89.
- 61 Lin ML, Bertics PJ: Laminin responsiveness is associated with changes in fibroblast morphology, motility, and anchorage-independent growth: cell system for examining the interaction between laminin and EGF signaling pathways. *J Cell Physiol.* 1995 Sep;164(3):593-604.
- 62 Lories RJ, Luyten FP: The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011 Jan;7(1):43-9.
- 63 Lowin T, Straub RH, Neumann E, Bosserhoff A, Vogel C, Moissl C, Anders S, Müller-Ladner U, Schedel J: Glucocorticoids increase alpha5 integrin expression and adhesion of synovial fibroblasts but inhibit ERK signaling, migration, and cartilage invasion. *Arthritis Rheum.* 2009 Dec;60(12):3623-32.

- 
- 64 Marx A, Hartmann M, Zettl A, Müller-Hermelink HK, Rüdiger T: Functional splenic pathology and differential diagnosis in splenectomy. *Pathologe*. 2008 Mar;29(2):109-14.
- 65 Mataran Pérez L, González Domínguez J, Rodríguez Pérez M, Rodrigo D, Abellán Pérez M, Salvatierra Ríos D: Plasma and intraerythrocytic zinc in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *An Med Interna*. 1989 Dec;6(12):629-32.
- 66 Mathies H, Wolff E: Study of the dose-reducing effect of acetaminophen on prednisolone. *Arzneimittelforschung*. 1980;30(8A):1438-40.
- 67 McEver RP: Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost*. 2001 Sep;86(3):746-56.
- 68 McGettrick HM, Smith E, Filer A, Kissane S, Salmon M, Buckley CD, Rainger GE, Nash GB: Fibroblasts from different sites may promote or inhibit recruitment of flowing lymphocytes by endothelial cells. *Eur J Immunol*. 2009 Jan;39(1):113-25.
- 69 McInnes IB, O'Dell JR: State-of-the-art: rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010 Nov;69(11):1898-906.
- 70 Mihara M, Ohsugi Y, Kishimoto T: Evidence for the role of Th17 cell inhibition in the prevention of autoimmune diseases by anti-interleukin-6 receptor antibody. *Biofactors*. 2009 Jan-Feb;35(1):47-51.
- 71 Moon SJ, Park MK, Oh HJ, Lee SY, Kwok SK, Cho ML, Ju JH, Park KS, Kim HY, Park SH: Engagement of toll-like receptor 3 induces vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Korean J Intern Med*. 2010 Dec;25(4):429-35.
- 72 Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T: Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(6):223.
- 73 Müller-Ladner U: *Evidenzbasierte Therapie in der Rheumatologie*, 2, Auflage. Uni-Med Science. 2007.
- 74 Nakamura M, Furukawa Y, Sasaki R, Masuyama J, Kikuchi J, Iwase S, Kudo T, Narimatsu H, Asakura S, Fujiwara S, Inokuchi J: UDP-GlcNAc:Galbeta1-->3GalNAc (GlcNAc to GalNAc) beta1-->6N-acetylglucosaminyltransferase holds a key role on the control of CD15s expression in human pre-B lymphoid cell lines. *Glycobiology*. 1999 Jan;9(1):1-12.

- 
- 75 Nehmann N, Wicklein D, Schumacher U, Müller R: Comparison of two techniques for the screening of human tumor cells in mouse blood: quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) versus laser scanning cytometry (LSC). *Acta Histochem.* 2010 Sep;112(5):489-96.
- 76 Neumann E, Lefèvre S, Zimmermann B, Gay S, Müller-Ladner U: Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends Mol Med.* 2010 Oct; 16(10):458-68.
- 77 Neumann E, Lefèvre S, Zimmermann B, Geyer M, Lehr A, Umscheid T, Schönburg M, Rehart S, Müller-Ladner U: Migratory potential of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: Additional perspectives. *Cell Cycle.* 2010 Jun 25;9(12).
- 78 Nurden AT: Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2011 Apr 11;(Suppl. 1).
- 79 Onal S, Nazıroğlu M, Colak M, Bulut V, Flores-Arce MF: Effects of Different Medical Treatments on Serum Copper, Selenium and Zinc Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Biol Trace Elem Res.* 2010. [Epub ahead of print]
- 80 Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S: Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2(5):361-7.
- 81 Pipp F, Heil M, Issbrücker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, Weich H, Fernandez B, Golomb G, Carmeliet P, Schaper W, Clauss M: VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res.* 2003 Mar 7;92(4):378-85.
- 82 Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P: Design principles of vascular beds. *Circ Res.* 1995 Nov;77(5):1017-23.
- 83 Rajan S, Ye J, Bai S, Huang F, Guo YL: NF-kappaB, but not p38 MAP kinase, is required for TNF-alpha-induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cells. *J Cell Biochem.* 2008 Oct 1;105(2):477-86.
- 84 Rath T, Rubbert A. Drug combinations with methotrexate to treat rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010 Sep-Oct;28(5 Suppl 61):S52-7.
- 85 Read MA, Neish AS, Luscinskas FW, Palombella VJ, Maniatis T, Collins T: The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. *Immunity.* 1995 May;2(5):493-506.

- 
- 86 Rissanen TT, Markkanen JE, Arve K, Rutanen J, Kettunen MI, Vajanto I, Jauhiainen S, Cashion L, Gruchala M, Närvänen O, Taipale P, Kauppinen RA, Rubanyi GM, Ylä-Herttuala S: Fibroblast growth factor 4 induces vascular permeability, angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit hindlimb ischemia model. *FASEB J*. 2003 Jan;17(1):100-2.
- 87 Roediger B, Ng LG, Smith AL, Fazekas de St Groth B, Weninger W: Visualizing dendritic cell migration within the skin. *Histochem Cell Biol*. 2008 Dec;130(6):1131-46.
- 88 Sager HB, Middendorff R, Rauche K, Weil J, Lieb W, Schunkert H, Ito WD: Temporal patterns of blood flow and nitric oxide synthase expression affect macrophage accumulation and proliferation during collateral growth. *J Angiogenes Res*. 2010 Sep 16;2:18.
- 89 Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Lanata L, Bagnasco M, Colombo M, Fischer F, D'Imporzano M: Pain and ketoprofen: what is its role in clinical practice? *Reumatismo*. 2010 Jul-Sep;62(3):172-88.
- 90 Sbrana S, Buffa M, Bevilacqua S, Spiller D, Parri MS, Gianetti J, De Filippis R, Clerico A: Granulocyte- and monocyte-platelet adhesion index in coronary and peripheral blood after extracorporeal circulation and reperfusion. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007 May;72(3):215-22.
- 91 Schaper W. Collateral circulation: past and present. *Basic Res Cardiol*. 2009 Jan;104(1):5-21.
- 92 Schierling W, Troidl K, Troidl C, Schmitz-Rixen T, Schaper W, Eitenmüller IK: The role of angiogenic growth factors in arteriogenesis. *J Vasc Res*. 2009;46(4):365-74.
- 93 Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW: Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010 Sep 25;376(9746):1094-108.
- 94 Seiler C: The human coronary collateral circulation. *Eur J Clin Invest*. 2010 May;40(5):465-76.
- 95 Siala M, Gdoura R, Fourati H, Rihl M, Jaulhac B, Younes M, Sibilia J, Baklouti S, Bargaoui N, Sellami S, Sghir A, Hammami A: Broad-range PCR, cloning and sequencing of the full 16S rRNA gene for detection of bacterial DNA in synovial fluid samples of Tunisian patients with reactive and undifferentiated arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009 Jul 1;11(4):R102.

- 
- 96 Siess DC, Vedder CT, Merkens LS, Tanaka T, Freed AC, McCoy SL, Heinrich MC, Deffebach ME, Bennett RM, Hefeneider SH: A human gene coding for a membrane-associated nucleic acid-binding protein. *J Biol Chem.* 2000 Oct 27;275(43):33655-62.
- 97 So EY, Ouchi T: The application of Toll like receptors for cancer therapy. *Int J Biol Sci.* 2010 Nov 3;6(7):675-81.
- 98 St Hill CA, Baharo-Hassan D, Farooqui M: C2-O-sLeX glycoproteins are E-selectin ligands that regulate invasion of human colon and hepatic carcinoma cells. *PLoS One.* 2011 Jan 19;6(1):e16281.
- 99 Stapleton WM, Chaurasia SS, Medeiros FW, Mohan RR, Sinha S, Wilson SE: Topical interleukin-1 receptor antagonist inhibits inflammatory cell infiltration into the cornea. *Exp Eye Res.* 2008 May;86(5):753-7.
- 100 Sumpio BE, Riley JT, Dardik A: Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Dec;34(12):1508-12.
- 101 Suzuki A, Yamakawa M, Tsukamoto M: The adhesion molecules, I-selectin and sialyl lewis x, relate to the formation of the follicular dendritic cell-lymphocyte cluster in the mantle zone. *Immunol Lett.* 2001 Dec 3;79(3):181-7.
- 102 Szekanecz Z, Besenyei T, Szentpétery A, Koch AE: Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2010 May;22(3):299-306.
- 103 Szekanecz Z, Koch AE: Vascular involvement in rheumatic diseases: 'vascular rheumatology'. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):224.
- 104 Tarner IH, Härle P, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S: The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2005 Feb;19(1):19-35.
- 105 Thairu N, Kiriakidis S, Dawson P, Paleolog E: Angiogenesis as a therapeutic target in arthritis in 2011: learning the lessons of the colorectal cancer experience. *Angiogenesis.* 2011. [Epub ahead of print]
- 106 Totani L, Evangelista V: Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Dec;30(12):2357-61.

- 107 Valentiner U, Haane C, Nehmann N, Schumacher U: Effects of bortezomib on human neuroblastoma cells in vitro and in a metastatic xenograft model. *Anticancer Res.* 2009 Apr;29(4):1219-25.
- 108 Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S: PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Dec;27(12):2514-23.
- 109 Woolley MM, Joergenson EJ: Splenectomy in blood dyscrasia. *Calif Med.* 1958 Apr;88(4):305-8.

---

## 10. PUBLIKATIONEN

### 10.1. Publikationen

Neumann E, Lefèvre S, **Zimmermann B**, Gay S, Müller-Ladner U: Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends Mol Med.* 2010 Oct; 16(10):458-68.

Eigener Anteil: Durchführung von Zell-Zell-Bindungsversuchen und der SCID-Maus Versuche, sowie Unterstützung bei der schriftlichen Präsentation und Korrektur des Manuskripts.

Frommer KW, **Zimmermann B**, Meier FM, Schröder D, Heil M, Schäffler A, Büchler C, Steinmeyer J, Brentano F, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E: Adiponectin-mediated changes in effector cells involved in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010 Oct; 62(10):2886-99.

Eigener Anteil: Isolation der Endothelzellen, die für die Stimulierungsversuche mit Adipozytokinen verwendet wurden.

Neumann E, Lefèvre S, **Zimmermann B**, Geyer M, Lehr A, Umscheid T, Schönburg M, Rehart S, Müller-Ladner U: Migratory potential of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: Additional perspectives. *Cell Cycle.* 2010 Jun 25; 9(12).

Eigener Anteil: Unterstützung bei der schriftlichen Präsentation des Review-Artikels und Korrektur des Manuskripts.

### 10.2. Vorträge und Poster

Bei unterstrichenem Vortrag oder Poster wurden diese selbst gehalten oder vorgestellt.

**Zimmermann B**, Ullrich S, Kesel N, Müller-Ladner U, Schumacher U, Neumann E: Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts use comparable mechanisms as leukocytes for vascular transmigration. Kongress der *European League Against Rheumatism (EULAR)*, London, 2011; angenommenes Poster

**Zimmermann B**, Fischer S, Lefèvre S, Schönburg M, Umscheid T, Müller-Ladner U, Preissner KT, Neumann E: Extrazelluläre RNA und DNA beeinflusst die Invasivität synovialer

---

Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Kongress der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin (DGIM), Wiesbaden, 2011; Poster

**Zimmermann B**, Fischer S, Lefèvre S, Umscheid T, Preissner KT, Müller-Ladner U, Neumann E: Vascular transmigration of synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis is influenced by extracellular RNA/DNA and the type of endothelial cells. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70:A21. Poster

**Zimmermann B**, Fischer S, Lefèvre S, Lehr A, Steinmeyer J, Stürz H, Rehart S, Umscheid T, Müller-Ladner U, Preissner KT, Neumann E: Invasiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts is affected by extracellular RNA and DNA. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(Suppl 10):1420. Vortrag

Lefèvre S, **Zimmermann B**, Geyer M, Lehr A, Stürz H, Steinmeyer J, Rehart S, Müller-Ladner U, Neumann E: Matrix components influence the aggressive Behavior of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(Suppl 10):S716. Poster

**Zimmermann B**, Fischer S, Lefèvre S, Umscheid T, Preissner KT, Müller-Ladner U, Neumann E: Influence of endothelial cells and extracellular RNA/DNA on the transmigration of synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Z Rheum.* 2010; 69(Suppl 1):10. Poster und Vortrag

Lefèvre S, **Zimmermann B**, Lehr A, Geyer M, Stürz H, Steinmeyer J, Rehart S, Müller-Ladner U, Neumann E: Extracellular matrix and associated components influence migration and adhesion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Z Rheum.* 2010; 69(Suppl 1):12. Poster

Frommer K, **Zimmermann B**, Schröder D, Meier F, Heil M, Steinmeyer J, Brentano F, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E: The Adipokine Adiponectin Affects Protein Secretion of Lymphocyte Subpopulations and Increases Migration of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *Z Rheum.* 2010; 69(Suppl 1):78. Vortrag

**Zimmermann B**, Fischer S, Lefèvre S, Umscheid T, Müller-Ladner U, Neumann E: Evidence for the role of extracellular RNA and DNA for the invasiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(Suppl 3):135. Vortrag

Lefèvre S, **Zimmermann B**, Lehr A, Stürz H, Steinmeyer J, Rehart S, Müller-Ladner U, Neumann E: Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts differ in their migratory behavior. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(Suppl 3):133. Poster

---

Lefèvre S, **Zimmermann B**, Geyer M, Lehr A, Stürz H, Steinmeyer J, Rehart S, Müller-Ladner U, Neumann E: Einfluß der extrazellulären Matrix auf die Migration der RA synovialen Fibroblasten. Med Klin. 2010; 105(Suppl 1):88. Poster

**Zimmermann B**, Lefèvre S, Fischer S, Gansler J, Frommer K, Stürz H, Steinmeyer J, Müller-Ladner U, Neumann E: Migrationsverhalten synovialer Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und deren Potential zur Induktion von Neoangiogenese Med Klin. 2010; 105(Suppl 1):89. Poster

Lefèvre S, **Zimmermann B**, Lehr A, Stürz H, Steinmeyer J, Rehart S, Müller-Ladner U, Neumann E: Migrating synovial fibroblasts – a homogenous population? Ann Rheum Dis. 2010; 69:A54. Poster und Vortrag

**Zimmermann B**, Lefèvre S, Fischer S, Gansler J, Lehr A, Rehart S, Stürz H, Steinmeyer J, Müller-Ladner U, Neumann E: Migratory Potential and Influence on Neoangiogenesis of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. Ann Rheum Dis. 2010; 69:A57. Poster

Frommer KW, **Zimmermann B**, Schröder B, Schäffler A, Büchler C, Brentano F, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E: Adiponectin Affects Gene Expression of Rheumatoid Arthritis Effector Cells Including Synovial Fibroblasts, Lymphocytes, Endothelial Cells and Chondrocytes. Arthritis Rheum. 2009; 60(Suppl):S615. Poster

**Zimmermann B**, Lefèvre S, Fischer S, Gansler J, Lehr A, Rehart S, Stürz H, Steinmeyer J, Müller-Ladner U, Neumann E: Aggressiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts is characterized by fast transendothelial migratory, invasive and neoangiogenic potential. Arthritis Rheum. 2009; 60(Suppl):S9-S10. Poster

Frommer K, **Zimmermann B**, Schröder D, Meier F, Schäffler A, Büchler C, Steinmeyer J, Brentano F, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E: Adiponektin induziert Genexpressionsänderungen in verschiedenen synovialen Zelltypen in der rheumatoiden Arthritis. Z Rheum. 2009; 68(Suppl 1):67. Poster

Lefèvre S, **Zimmermann B**, Benninghoff S, Lehr A, Stürz H, Steinmeyer J, Rehart S, Müller-Ladner U, Neumann E: Migration von Subpopulationen primärer synovialer Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Z Rheum. 2009; 68(Suppl 1):25. Poster

**Zimmermann B**, Lefèvre S, Gansler J, Fischer S, Frommer K, Lehr A, Stürz H, Steinmeyer J, Rehart S, Müller-Ladner U, Neumann E. Transmigration und Invasion sind frühe Prozesse im SCID-Maus Modell der rheumatoiden Arthritis. Z Rheum. 2009; 68(Suppl 1):75. Poster

---

**Zimmermann B**, Lefèvre S, Fischer S, Gansler J, Lehr A, Rehart S, J Steinmeyer J, Müller-Ladner U, Neumann E: Interaction between endothelium and migratory rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Kongress "Infection of the Endothelium", Dresden, 2009. Poster

Frommer KW, **Zimmermann B**, Schröder D, Schäffler A, Büchler C, Steinmeyer J, Brentano F, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E: Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, lymphocytes, endothelial cells and chondrocytes respond to adiponectin by altered gene expression. Ann Rheum Dis. 2009; 68(Suppl 3):360. Poster

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

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

Frommer K, **Zimmermann B**, Meier FM, Schäffler A, Büchler C, Steinmeyer J, Brentano F, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E. Adiponektin beeinflusst die Genexpression synovialer Fibroblasten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis sowie die Genexpression von Lymphozyten, Endothelzellen und Chondrozyten. Med Klin. 2009; 104(Suppl). Poster

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

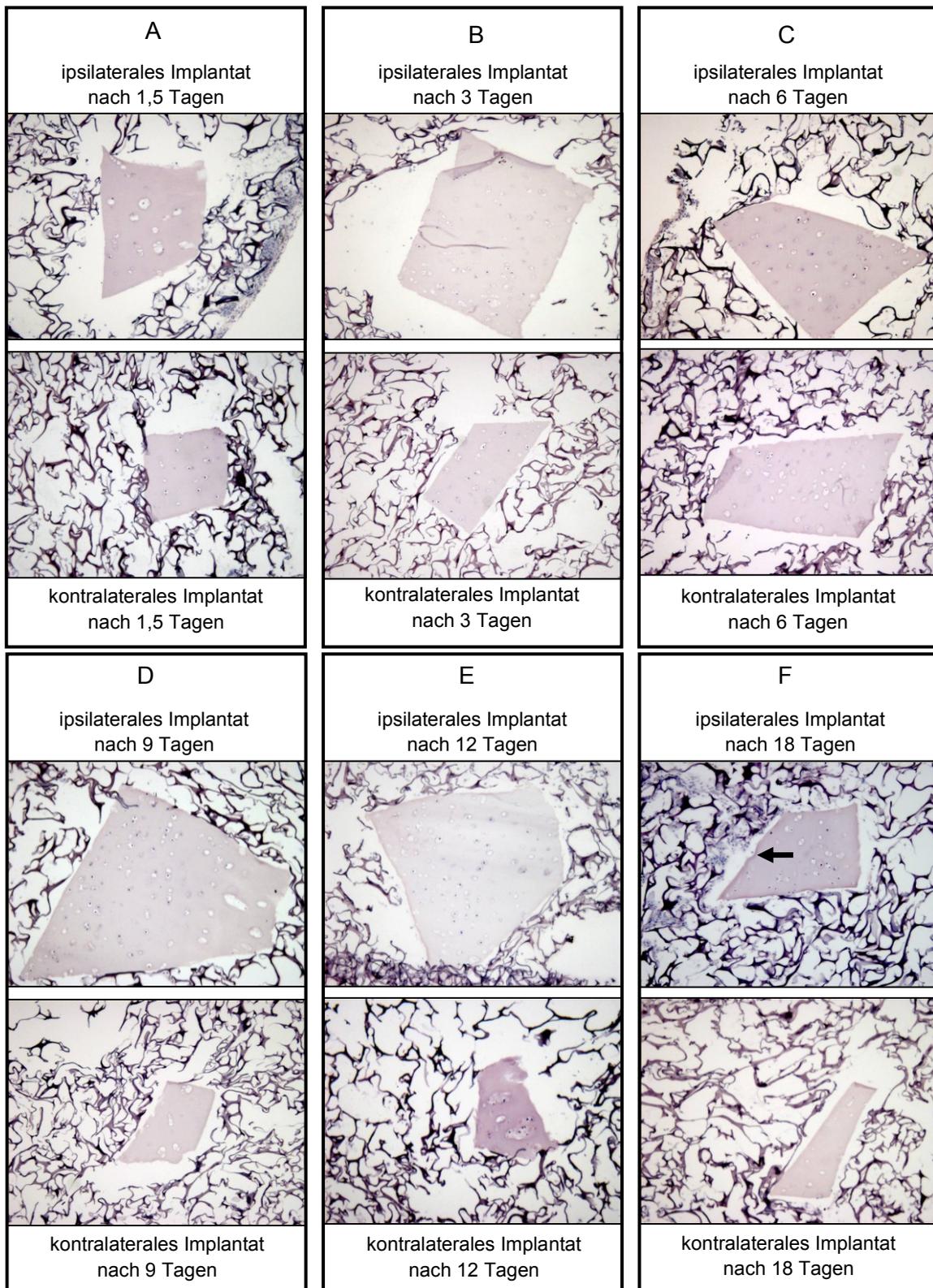
Frommer K, Schröder D, **Zimmermann B**, Meier F, Schäffler A, Büchler C, Steinmeyer J, Brentano F, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E: Adiponectin affects gene expression of rheumatoid synovial fibroblasts, lymphocytes, endothelial cells and chondrocytes. Ann Rheum Dis. 2009; 68:A60. Poster

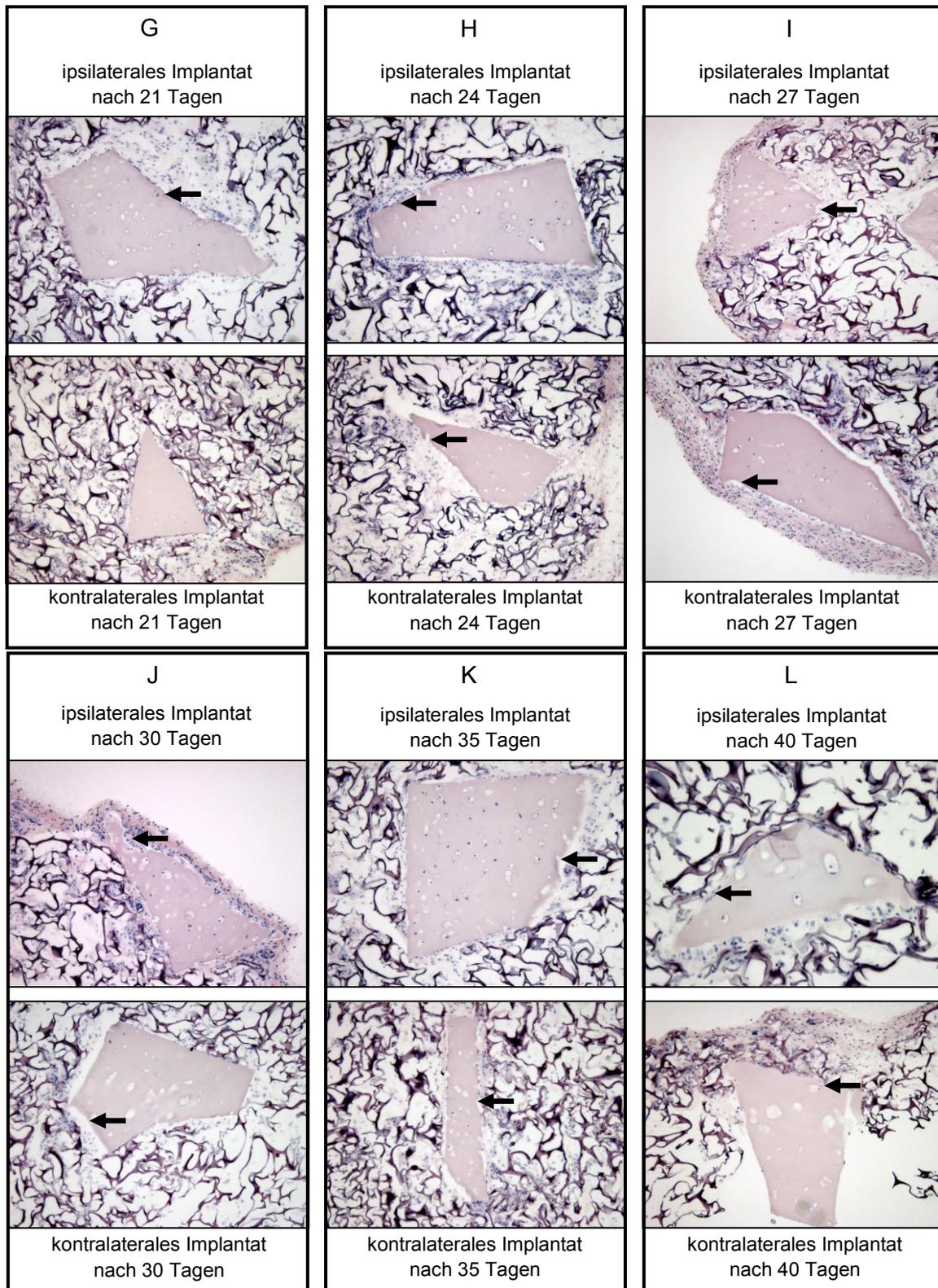
Lefèvre S, Knedla A, **Zimmermann B**, Steinmeyer J, Stürz H, Pap T, Müller-Ladner U, Neumann E: Effects of VCAM-1 and TNFa inhibition on the migratory potential of rheumatoid synovial fibroblasts in the SCID mouse model of RA. Arthritis Rheum. 2008; 58(Suppl 1):S262 Poster

Lefèvre S, Knedla A, **Zimmermann B**, Stürz H, Steinmeyer J, Pap T, Müller-Ladner U, Neumann E: Auswirkung von VCAM-1 und TNF $\alpha$ -Hemmung auf das Migrationspotential rheumatoider synovialer Fibroblasten im SCID-Maus Modell der RA. Z Rheum. 2008; 67(Suppl 1):44. Poster

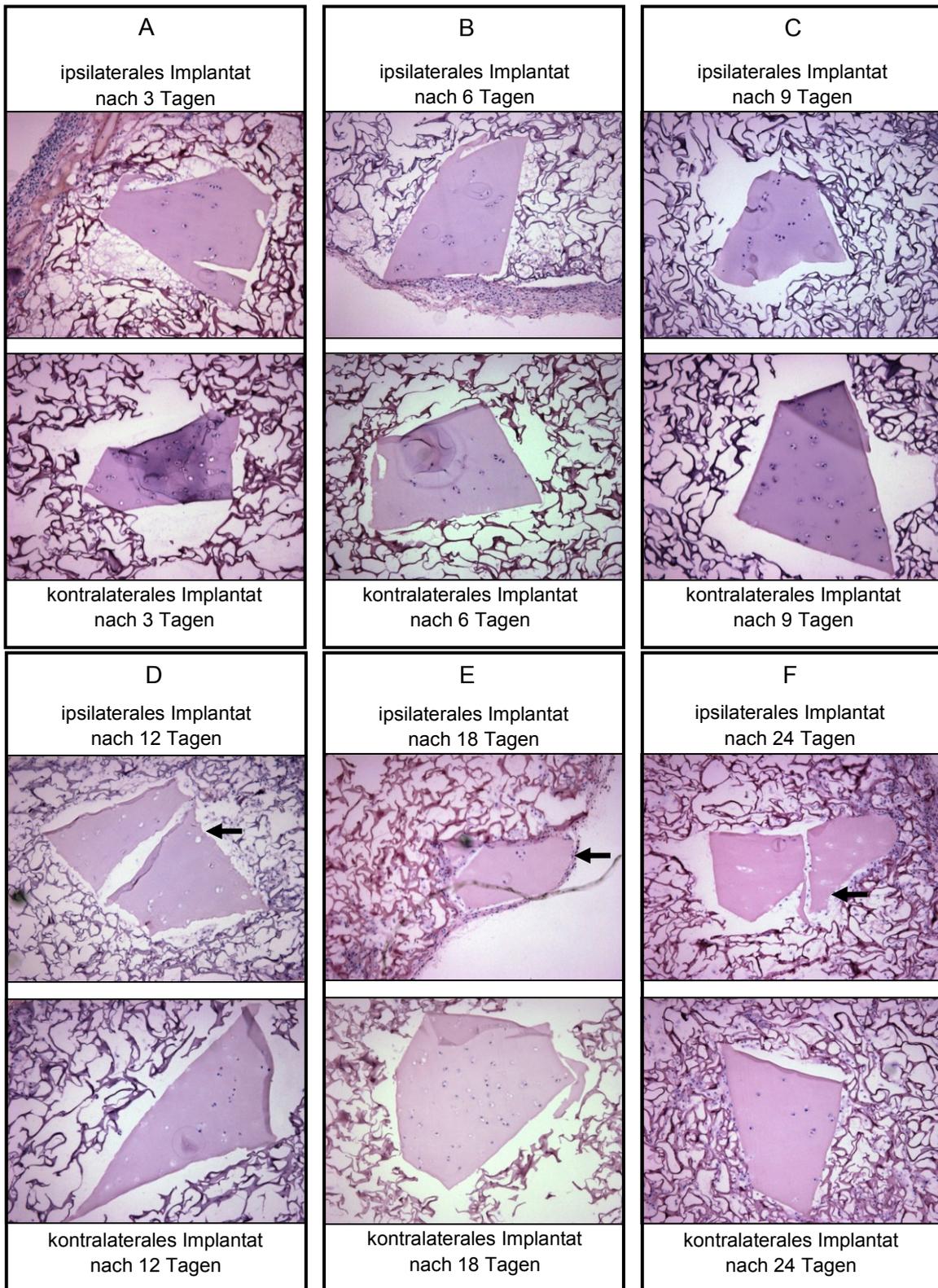
Neumann E, Brückmann S, Funk D, **Zimmermann B**, Lefèvre S, Steinmeyer J, Fiehn C, Frei E, Müller-Ladner U: Effects of Dexamethasone towards cartilage destruction in the SCID mouse model for RA. Z Rheum. 2008, 67(Suppl 1):49. Poster

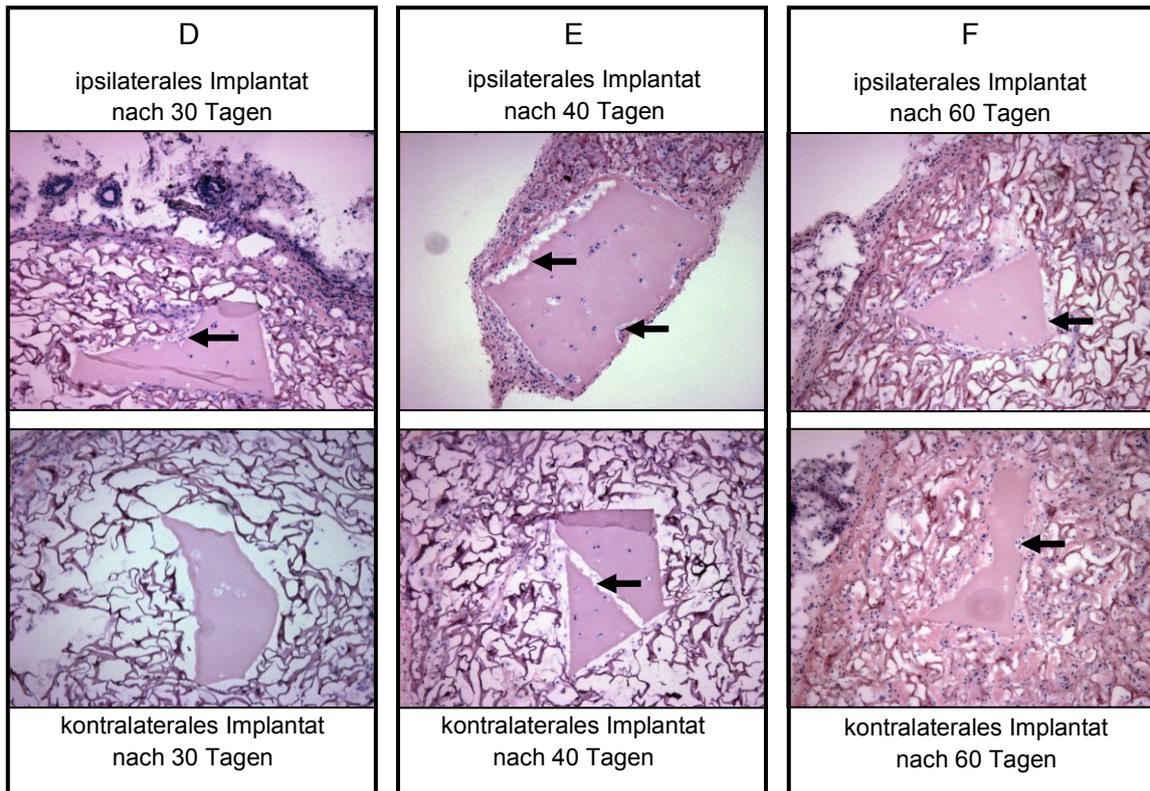
11. ANHANG



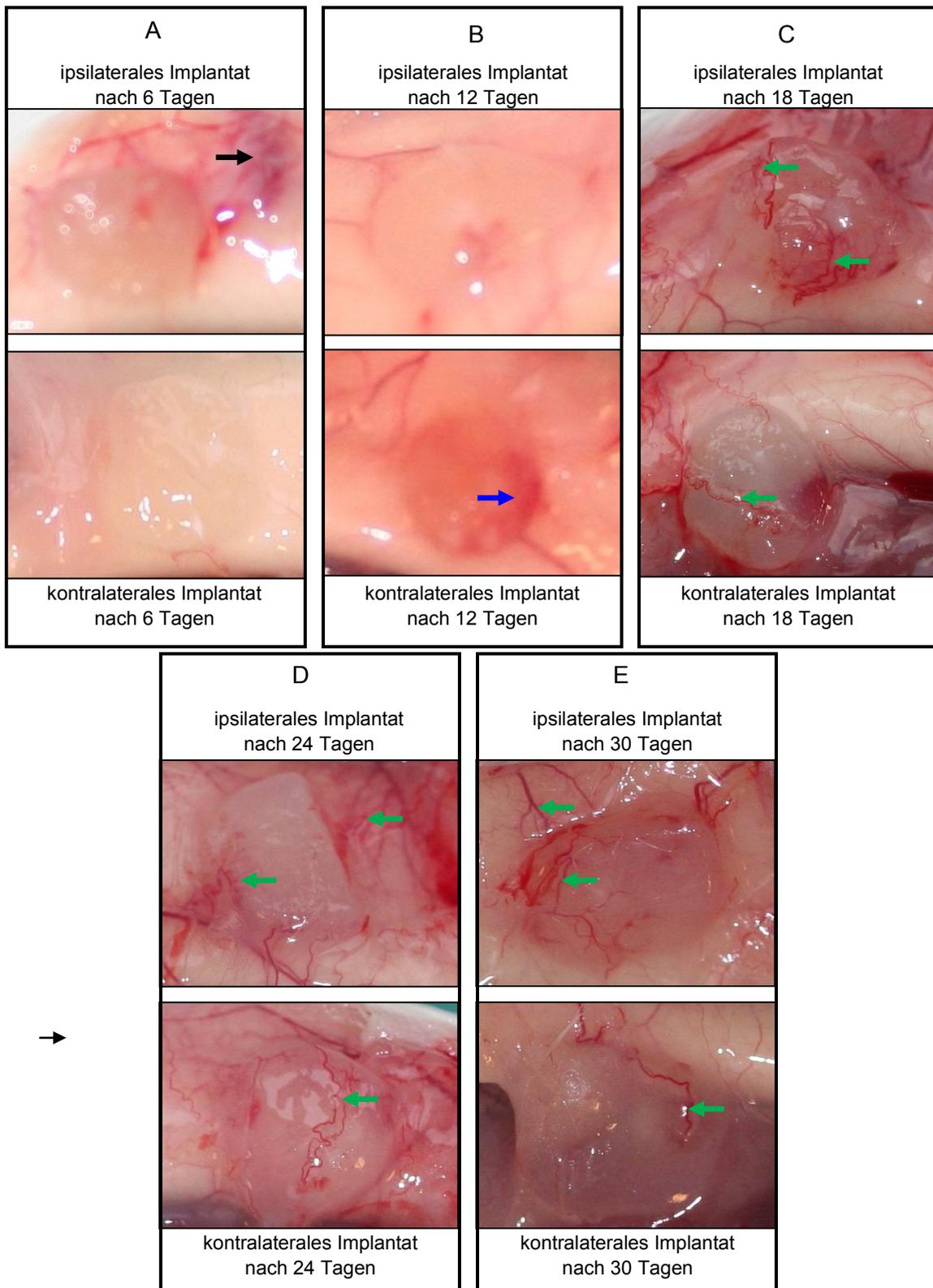


**Abb. 49: Implantate des zweiten SCID-Maus Versuchs nach verschiedenen Zeitpunkten.** Ipsilateral sind ab Tag 18 adhärenente RASF an der Knorpelmatrix zu sehen, die diese invadieren. Auf der kontralateralen Seite war eine Adhäsion ab Tag 21 und die erste Invasion ab Tag 24 zu erkennen. (←): RASF-bedingte Knorpelinvasion.

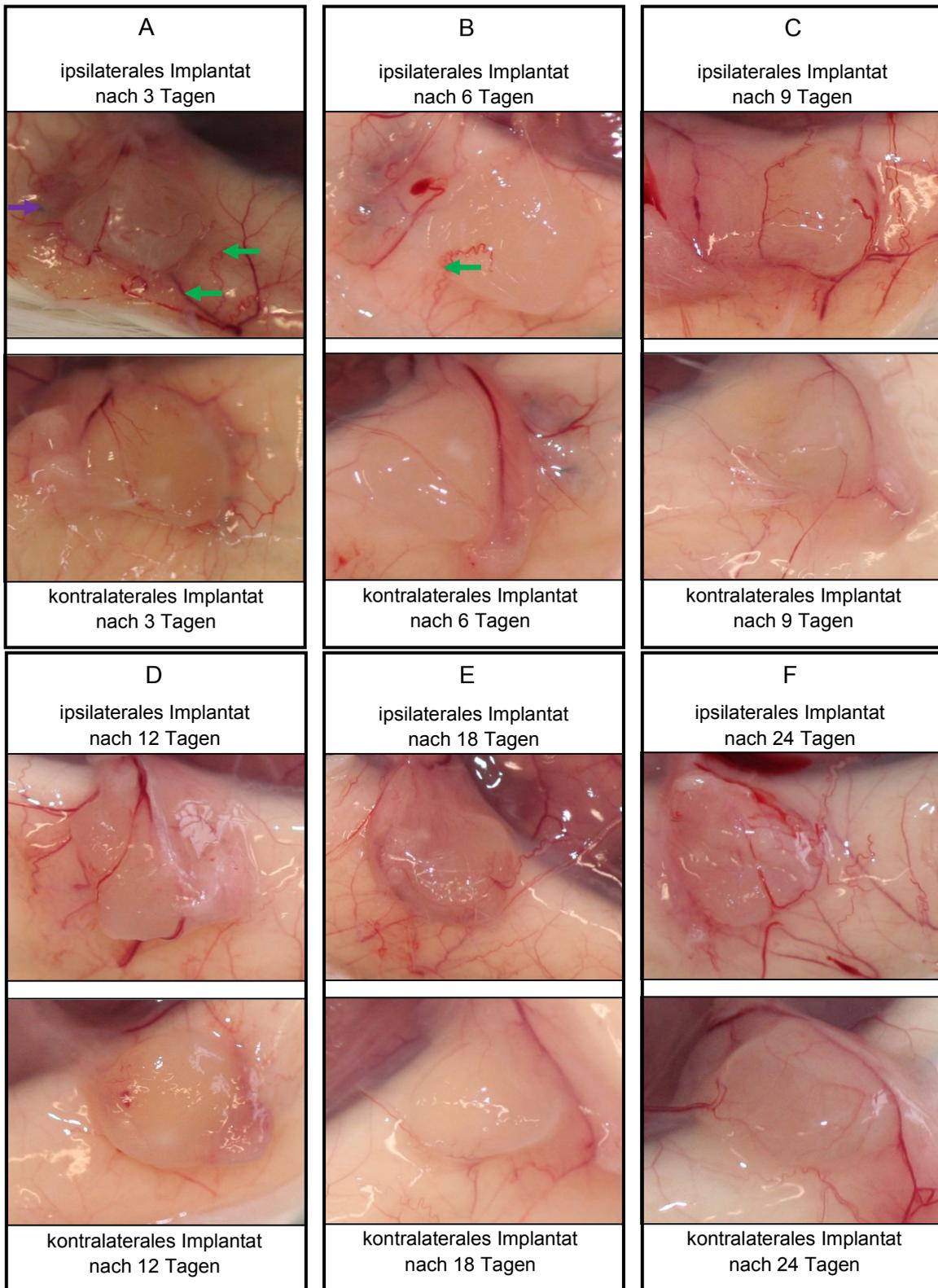


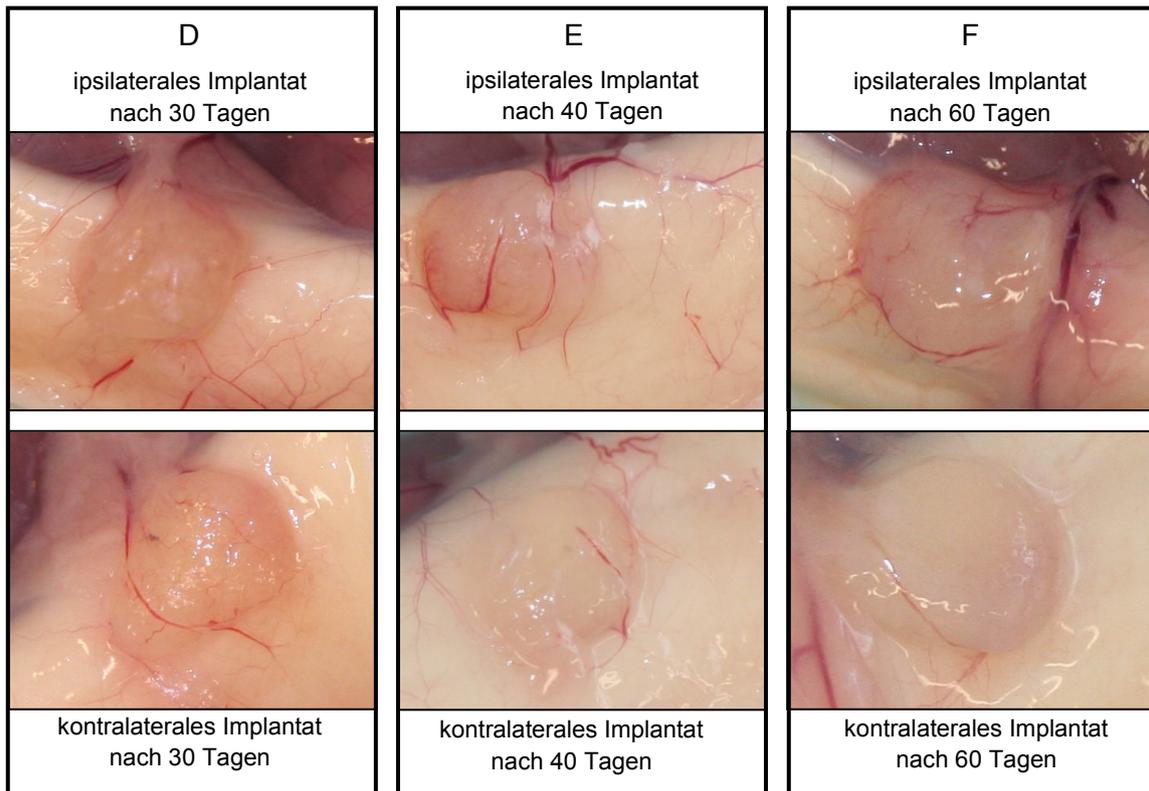


**Abb. 50: Implantate des dritten SCID-Maus Versuchs an verschiedenen Zeitpunkten.** Ipsilateral sind ab Tag 12 adhärenzte RASF an der Knorpelmatrix zu sehen, die diese invadieren. Auf der kontralateralen Seite war eine Adhäsion ab Tag 24 und die erste Invasion ab Tag 40 zu erkennen. (←): RASF-bedingte Knorpelinvasion.

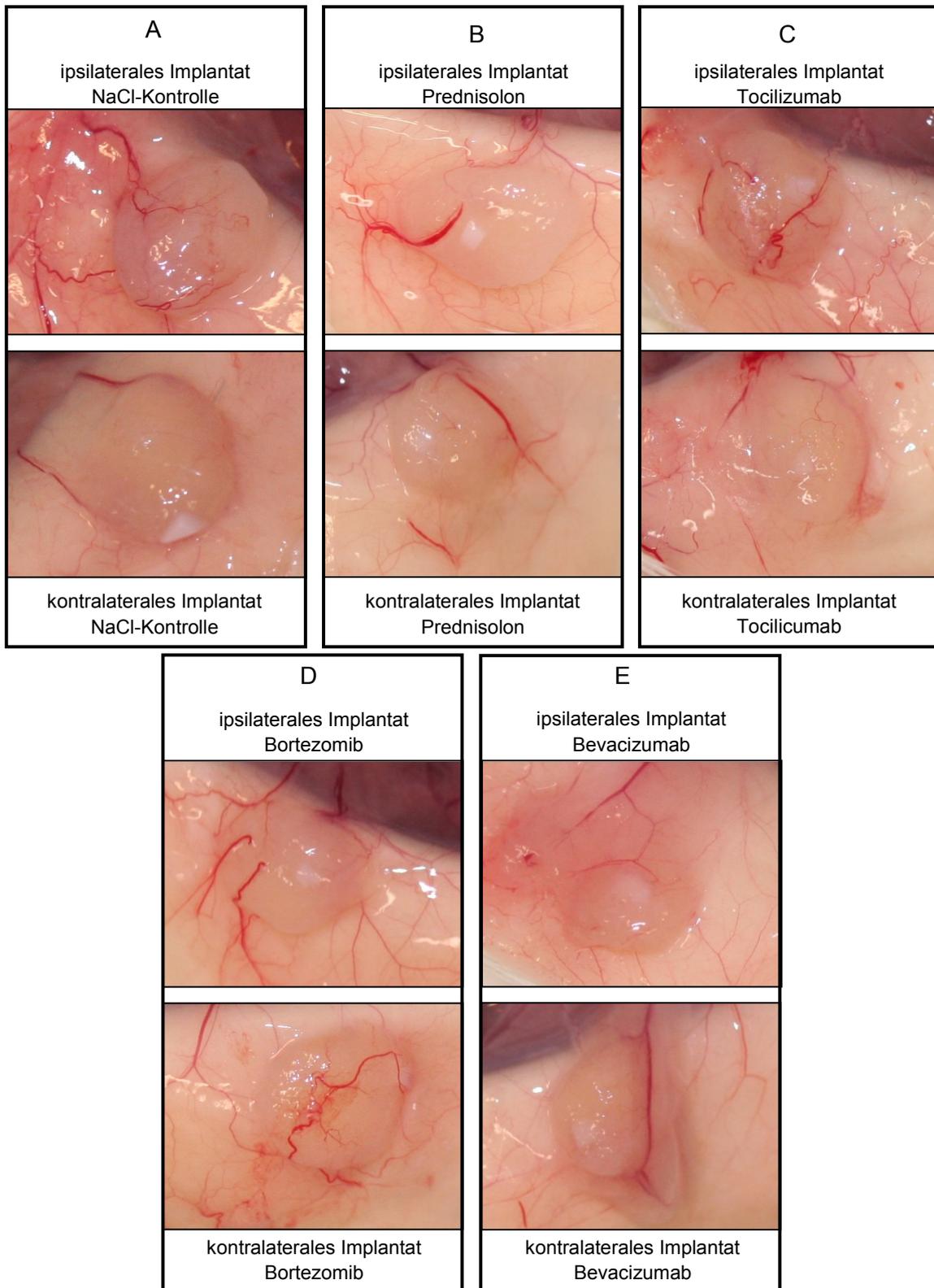


**Abb. 51: Gefäßneubildung an den Implantate des ersten SCID-Maus Versuchs zu verschiedenen Zeitpunkten.** A-E: Implantate je eines Tieres (oben: ipsilateral; unten kontralateral) mit umliegendem murinen Gewebe. Deutliche Gefäßneubildung außerhalb der Trägermatrix ab Tag 6 nachweisbar (A) gefäßneubildung an der Narbe (→). (C-E), korkenzieherartiger Gefäßaufbau (←) während des gesamten sichtbar. (B): Tag 12 Eine operationsbedingte-Einblutung (→) kontralateral sichtbar. Ab Tag 18 (C), sukzessive Zunahme der Vaskularisierung im Inneren der Gelatinematrix sichtbar. Unterschied zwischen ipsi- und kontralateraler Gefäßneubildung war nur zu Beginn erkennbar, (Tag 6 und 12).





**Abb. 52: Gefäßneubildung an den Implantate des dritten SCID-Maus Versuchs zu verschiedenen Zeitpunkten.** A-F: Implantate je eines Tieres (oben: ipsilateral; unten kontralateral) mit umliegendem murinen Gewebe. Deutliche Gefäßneubildung außerhalb der Trägermatrix ab Tag 3 nachweisbar (A-C), korkenzieherartiger Gefäßaufbau (←). (A): Tag 3 eine starke Durchblutung ipsilateral, klar vom Wundheilungsgewebe der Narbe (→) abgrenzbar. Ab Tag 9 (D), sukzessive Zunahme der Vaskularisierung im Inneren der Gelatinematrix sichtbar. Unterschied zwischen ipsi- und kontralateraler Gefäßneubildung war zu jedem Zeitpunkt erkennbar.



**Abb. 53: Neovaskularisierungs-Induktion durch RASF nach 60 tägigen Behandlung mit Prednisolon oder Biologika im SCID-Maus Modell.** Die ipsilateralen Implantate mit koimplantierten RASF (oben) sind stärker vaskularisiert als die kontralateralen Implantate ohne RASF (unten). Eine Reduktion der Gefäßneubildung im Vergleich zur NaCl-Kontrolle wurde nur mit Prednisolon und Bevacizumab erreicht. Prednisolon und Bevacizumab zeigten eine geringere Gefäßneubildung im Vergleich zur Kontrolle.

---

## **Erklärung**

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

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**

---

## **Und zum Schluss...**

Möchte ich mich ganz herzlich bei all den Menschen bedanken, die mir während der Doktorarbeit zur Seite gestanden haben:

Bei Prof. Dr. Müller-Ladner für die Vergabe des Doktorarbeitsthemas und für die Möglichkeit an vielen Kongressen und Seminaren teilnehmen zu können. Außerdem bedanke ich mich für die sehr inspirativen Gespräche, die ich mit ihm führen konnte.

Bei Prof. Dr. Martin für die Unterstützung und die Bereitschaft diese Doktorarbeit zu betreuen.

Bei Frau Dr. Neumann für ihre motivierende Art und ihre Unterstützung bei allen Hindernissen, sowie für ihre Hilfe beim Fokussieren.

Bei Prof. Dr. Schumacher, Dr. Sebastian Ullrich und Nina Kesel für Ihrer freundschaftliche Zusammenarbeit bei der Durchführung der Flusskammerversuche und dafür, dass sie mir die Selektin-defizienten Mäuse zur Verfügung gestellt haben.

Bei Prof. Dr. Preissner, Dr. Silvia Fischer und Julia Gansler für ihre Hilfe beim Transmigrationsassay.

Bei Dr. Stephanie Lefèvre für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Maus-OPs und bei Simone Benninghoff, die auf jede Frage eine Antwort wusste und mir bei der Zellkultur sowie bei den Tierversuchen sehr geholfen hat.

Bei Dr. Marvin Peters der mich auf eine Art kritisieren kann, die ich ihm nicht übel nehme und bei Dr. Klaus Frommer, der immer ein offenes Ohr hatte und dessen Ratschläge mir immer sehr geholfen haben.

Bei Grit Krumbholz für ihre Hilfe bei der PCR, bei Mariana Schuck, die nur kurz bei uns war aber immer für zwei gearbeitet hat und Sina Köppert für ihre Hilfe am Kyostat.

Bei Carina Schreyäck und Susann Junker für ihre freundschaftliche Unterstützung sowie bei Dr. Massimiliano Vasile, Dr. Ingo H. Tarner, Dr. Robert Dinser, Sabrina Brückmann, Rosel Engel, Dirk Schröder, Astrid Mexia, Matthias Geyer und vor allem bei denen die ich vergessen habe.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Familie insbesondere an meine Eltern und meine beste Freundin Anja, die mich während meiner gesamten Studienzeit und bis heute unterstützt haben, sowie an Thorsten, auf den ich mich immer 100%ig verlassen konnte.