

Untersuchung von gentherapeutischen Ansätzen für die rheumatoide Arthritis anhand des SCID-Maus-Modells



DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elena Neumann
aus München

Regensburg, 2001

Diese Arbeit wurde von Prof. Dr. S. Modrow angeleitet.

Promotionsgesuch eingereicht am: 18.12.2001

Mündliche Prüfung: 19.03.2002

Prüfungsausschuß:

- Vorsitzender: Prof. Dr. G. Hauska
- 1. Gutachter: Prof. Dr. S. Modrow
- 2. Gutachter: PD Dr. U. Müller-Ladner
- 3. Prüfer: Prof. Dr. R. Wirth
- Ersatzprüfer: Prof. Dr. A. Kurtz

INHALT

I. EINLEITUNG	5
1. RHEUMATOIDE ARTHRITIS	5
1.1 <i>Das Gelenk</i>	6
1.2 <i>Das Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis</i>	7
1.2.1 <i>Synoviale Hyperplasie und Knorpeldestruktion</i>	8
1.2.2 <i>Entzündung</i>	12
1.3 <i>Klassifizierung der RA</i>	14
1.4 <i>Theorien zur Entstehung der RA</i>	14
1.5 <i>Gentherapeutische Ansätze bei der RA</i>	17
II. FRAGESTELLUNG	21
III. MATERIAL UND METHODEN	23
1. MATERIAL	23
1.1 <i>Chemikalien und Materialien</i>	23
1.2 <i>Zellen und Organismen</i>	25
1.3 <i>Oligonukleotide</i>	25
1.4 <i>Vektoren und Plasmide</i>	27
1.5 <i>Antikörper</i>	27
1.6 <i>Kits und Standards</i>	28
1.7 <i>Geräte</i>	29
2. METHODEN	30
2.1 <i>Zellbiologische Methoden</i>	30
2.1.1 <i>Asservation der Gewebe</i>	30
2.1.2 <i>Einfrieren der Synovialgewebe</i>	30
2.1.3 <i>Isolierung der Fibroblasten aus Synovialgewebe</i>	30
2.1.4 <i>Zellkultur</i>	31
2.1.5 <i>Passagierung von Zellen</i>	31
2.1.6 <i>Zellzahlbestimmung</i>	32
2.1.7 <i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i>	32
2.1.8 <i>Stimulierungsversuche</i>	33
2.2 <i>Viraler Gentransfer</i>	33
2.2.1 <i>Adenoviraler Gentransfer</i>	33
2.2.2 <i>Retroviraler Gentransfer</i>	34
2.2.3 <i>β-Galaktosidase Nachweis</i>	35
2.2.4 <i>Überstandstransfer</i>	35
2.3 <i>SCID-Maus-Modell der RA</i>	36
2.3.1 <i>Koimplantierung von Zellen/Geweben und Knorpel in die SCID-Maus</i>	36
2.4 <i>In situ Hybridisierung</i>	39
2.4.1 <i>Puffer und Lösungen</i>	39

2.4.2 Herstellung der Sonden für die in situ Hybridisierung.....	40
2.4.3 Hybridisierung.....	40
2.4.4 Immunhistologischer Nachweis.....	41
2.5 Immunhistochemie.....	42
2.5.1 Immunogold-Silbertechnik.....	42
2.5.2 Phosphatase Immunhistochemie (AEC Substrat-Kit).....	43
2.5.3 Immunzytochemie.....	43
2.6 ELISA.....	44
3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	44
3.1 RNA Isolierung.....	44
3.1.1 RNA-Konzentrationsbestimmung.....	44
3.2 Oligonukleotid-Design.....	45
3.3 RT-PCR.....	46
3.3.1 Reverse Transkription.....	46
3.3.2 PCR.....	46
3.4 QuantumRNA ⁰ -PCR.....	47
3.4.1 Reverse Transkription.....	47
3.4.2 PCR.....	47
3.4.3 Phosphorimaging.....	48
3.5 Realtime-PCR mit einem LightCycler.....	48
3.5.1 PCR-Optimierung für den LightCycler.....	49
3.5.2 Reverse Transkription.....	50
3.5.3 PCR.....	50
3.5.4 Auswertung.....	51
3.6 RNA arbitrarily primed PCR.....	51
3.6.1 Reverse Transkription für RAP-PCR.....	51
3.6.2 AP-PCR.....	52
3.7 cDNA-Array.....	52
3.7.1 Puffer und Lösungen.....	53
3.7.2 Herstellung der Hybridisierungsprobe.....	53
3.7.3 Säulenaufreinigung.....	54
3.7.4 Hybridisierung.....	54
3.7.5 Waschen.....	54
3.7.6 Phosphorimaging.....	55
3.7.7 Auswertung mittels der Atlas TM 2.0 Software.....	55
3.7.8 Strippen der Membranen.....	56
3.8 Gelelektrophorese.....	57
3.8.1 Puffer und Lösungen.....	57
3.8.2 Agarosegele.....	57
3.8.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	58
3.8.4 Polyacrylamidgele.....	58
3.9 Klonierung, Sequenzierung und Sequenzauswertung.....	59
3.9.1 Klonierung.....	59
3.9.2 DNA-Sequenzierung.....	60

3.9.3 Sequenzauswertung	60
3.10 Statistische Analysen	61
3.11 Experimentelles Design der Gentransfer-Experimente.....	61
IV. ERGEBNISSE.....	63
1. ETABLIERUNG DER METHODEN.....	63
1.1 Kombination RAP-PCR und cDNA-Array.....	63
1.1.1 Differenziell exprimierte Gene im Vergleich von RA- vs. OA-Fibroblasten.....	64
1.2 Etablierung der adenoviralen bzw. retroviralen Transduktion von synovialen Fibroblasten ..	70
1.3 Etablierung des SCID-Maus-Modells.....	72
1.3.1 Immunhistochemischer Nachweis humaner Zellen an der Invasionszone.....	73
1.3.2 Immunzytochemie für IL-10 Rezeptor.....	74
1.3.3 IL-6 ELISA mit SCID-Maus Seren.....	76
2. MOLEKULARE EFFEKTE NACH GENTRANSFER.....	76
2.1 Einzelner Gentransfer von sTNF RI, IL-10 oder IL-1Ra.....	76
2.1.1 Molekulare Veränderungen nach sTNF RI Gentransfer	76
2.1.2 Molekulare Veränderungen nach IL-10 oder IL-1Ra Gentransfer.....	79
2.2 Doppelter Gentransfer	80
2.2.1 Molekulare Veränderungen nach Doppelgentransfer mit IL-10 bzw. IL-1Ra mit sTNF RI.....	80
2.2.2 Molekulare Veränderungen nach IL-10 und IL-1Ra Doppelgentransfer	80
2.3 Dreifacher Gentransfer von sTNF RI, IL-1Ra und IL-10	83
2.3.1 Molekulare Veränderungen nach IL-10/IL-1Ra/sTNF RI Gentransfer	83
3. EFFEKTE VON GENTRANSFER AUF KNORPELDESTRUKTION	84
3.1.1 Effekte auf Knorpeldestruktion nach sTNF RI Gentransfer	84
3.1.2 Effekte auf Knorpeldestruktion nach IL-10 oder IL-1Ra Gentransfer.....	85
3.1.3 Effekte auf Knorpeldestruktion nach Gentransfer von IL-10 bzw. IL-1Ra mit sTNF RI.....	85
3.1.4 Effekte auf Knorpeldestruktion von IL-10 und IL-1Ra.....	85
V. DISKUSSION.....	88
1. ETABLIERUNG DER TECHNIKEN.....	88
1.1 Etablierung der cDNA-Array Technik.....	88
1.1.1 Analyse der differentiellen Expression von synovialen RA- vs. OA-Fibroblasten.....	90
1.2 Etablierung des Gentransfers in synoviale Fibroblasten.....	93
1.3 Etablierung histologischer Techniken.....	93
2. GENTRANSFER VON ZYTOKINEN UND ZYTOKINHEMMERN	95
2.1 Molekulare Gentransfer-Effekte	96
2.1.1 Einzelner Gentransfer	96
2.1.2 Doppelter Gentransfer	97
2.1.3 Dreifacher Gentransfer	98
2.2 Auswirkungen des Gentransfers auf die Knorpeldestruktion	98
2.2.1 Einzelner Gentransfer	99
2.2.2 Doppelter Gentransfer	99
2.2.3 Dreifacher Gentransfer	100
3. MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER KNORPELPROTEKTION NACH IL-10 UND IL-1RA GENTRANSFER.....	101

Inhaltsangabe	4
<hr/>	
VI. ZUSAMMENFASSUNG	105
VII. ABKÜRZUNGEN	108
VIII. REFERENZEN	110
IX. PUBLIKATIONEN	126
1. PUBLIKATIONEN.....	126
2. VORTRÄGE UND POSTER.....	127
X. ANHANG	131

I. EINLEITUNG

1. Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) gehört zum rheumatischen Formenkreis, welcher den systemischen Lupus erythematoses, das Sjögren Syndrom, die Spondylarthritis ankylopoetica, die Sklerodermie und andere Erkrankungen mit entzündlichen Veränderungen an Gelenken und Weichteilen umfaßt.

Bei RA als primär entzündlicher Erkrankung geht mit zunehmender Gelenkdestruktion eine chronisch proliferierende Synovitis einher. Erhebliche Anstrengungen in den letzten Jahren konzentrierten sich auf die Aufklärung der Pathogenese der RA und der Faktoren die dabei eine Rolle spielen. Verschiedene Tiermodelle und neue molekularbiologische Methoden haben zwar zu einem besseren Verständnis der Prozesse geführt, die für die Entstehung der RA relevant sind, jedoch ist die Genese auch bis heute noch weitgehend unbekannt.

Etwa 1 % der Weltbevölkerung und 0,5-1 % der europäischen Bevölkerung sind heutzutage von der RA betroffen (Lawrence et al., 1989). Die stärkste Inzidenz liegt in der dritten bis fünften Lebensdekade, wobei jedoch kein Alter ausgeschlossen ist (Yukioka et al., 1998). 2–3x mehr Frauen als Männer sind von der RA betroffen. Ca. 10 % der 37 Mio. operativen Eingriffe an Gelenken 1985 in den USA wurden aufgrund arthritischer Veränderungen durchgeführt. Ohne Behandlung führt eine RA bei 50 % der Patienten innerhalb der ersten zwei Erkrankungsjahre zu einer dauerhaften Schädigung der betroffenen Gelenke (Firestein, 1998). Die Zahl der Arztbesuche und Krankenhausaufenthalte ist bei Patienten mit RA etwa doppelt so hoch wie bei der Normalbevölkerung. Somit gehört die RA unter Berücksichtigung der Kosten für Diagnose, Therapie, Rehabilitation und den Einkommensverlusten der Patienten zu den teuersten Krankheiten.

Die Arthrose, deren Bezeichnung Arthritis deformans von Virchow 1869 geprägt wurde, wird mit dem Begriff „Osteoarthritis“ (= Polyarthrose, OA) von der rheumatoiden Arthritis unterschieden. Die Genese der OA ist eher biomechanischer und sekundär entzündlicher Art mit einer ähnlichen Verteilung der betroffenen Gelenke sowie der Entzündungsmediatoren wie bei der RA. Daher werden Gewebe von Patienten mit OA in der Regel als Kontrollgruppe zum Vergleich zur RA herangezogen.

1.1 Das Gelenk

Das gesunde Gelenk besteht aus zwei mit Knorpel überzogenen Knochen, die durch den Synovialsplatt voneinander getrennt sind. Der Spalt ist mit Synovialflüssigkeit gefüllt, deren Viskosität die Gleitfähigkeit und Beweglichkeit des Gelenks gewährleistet (Simkin, 1995). Das Gelenk wird von der Gelenkkapsel umschlossen. Die innerste Schicht der Gelenkkapsel bildet die Gelenkhaut (Synovium). Die Grenzzellschicht des Synoviums, auch „lining layer“ oder *Intima* genannt, die nur aus wenigen, ca. 1-3 dichten Zellschichten besteht und an den Gelenkspalt angrenzt, geht in die bindegewebsartige *Subintima*, auch „sublining“ genannt, über, welche an die Gelenkkapsel angrenzt (Abbildung 1).

Die verschiedenen hochdifferenzierten Bindegewebe des Gelenks setzen sich hauptsächlich aus Kollagen, Proteoglykan und Glykoproteinen zusammen. Knochen besteht hauptsächlich aus mineralisiertem Kollagen, Knorpel aus Kollagen in Verbindung mit Proteoglykanen und Sehnen sowie Bänder aus Kollagen mit geringem Proteoglykananteil.

Knorpel besteht aus einer Kollagen- und Glykosaminoglykan-Matrix, die isoliert in der Matrix liegende Chondrozyten umgibt. Den Hauptanteil des Kollagens stellt Kollagen Typ II. Kollagen Typ IX verbindet Kollagen Typ II und die Proteoglykane miteinander. Weiterhin besteht die Knorpelmatrix aus mehreren anderen Glykoproteinen, sowie zu geringen Anteilen aus Kollagen Typ V, X und XI. Chondrozyten, die weniger als 2 % des Knorpelvolumens ausmachen (Stockwell et al., 1979), sind für die Erhaltung der Knorpelmatrix mittels sezernierten Matrixkomponenten, Matrix-abbauenden Enzymen sowie Zytokinen verantwortlich.

Die Deckzellschicht des normalen Synoviums nimmt Funktionen wie Schutz, Trennung der Gewebe voneinander und Filtration von diffundierenden Molekülen wahr, die ansonsten epitheliale Gewebe erfüllen. Sie besitzt jedoch keine epithelialen Strukturen wie eine abschließende Membran oder „tight junctions“, welche einzelne Zellen verbinden, obwohl die meisten Komponenten der Basalmembran (ausser Entacin) im Synovium vorhanden sind (Harris, 1997). Die synoviale Deckzellschicht besteht hauptsächlich aus synovialen Fibroblasten und Makrophagen. Ursprünglich wurden diese Zellen als makrophagenähnliche Typ A- und fibroblastenartige Typ B-Synoviozyten bezeichnet. Diese Zellen nehmen sowohl im gesunden als auch rheumatoiden Synovium verschiedene Funktionen wahr.

Synoviale Fibroblasten: Die Hauptfunktionen der synovialen Fibroblasten der gesunden Deckzellschicht liegen in der Versorgung des Gelenkinnenraums und des Knorpels mit Sauerstoff und Proteinen sowie in der Aufrechterhaltung der Viskosität der Synovialflüssigkeit, z.B. durch Hyaluronsäure. Ihre physiologische Funktion ist durch einen aktiven Golgi-Apparat gekennzeichnet. Synoviale Fibroblasten können, je nach umgebendem Milieu, an Knorpelumbau-Prozessen beteiligt sein. Diese sind notwendig, da durch ständige Bewegung und hohe Traglast auf dem Gewebe kleine Läsionen im Knorpel immer wieder ausgeglichen werden müssen. Im rheumatischen Gewebe dominieren jedoch abbauende gegenüber versorgenden Prozessen, was zu einer irreversiblen Zerstörung des Knorpels und auch des Knochens führt (Gay et al., 1993; Firestein, 1996).

Synoviale Makrophagen: Die synovialen Makrophagen besitzen neben ihrer phagozytischen Aktivität auch die Funktion von APZ (Antigen präsentierenden Zellen). Sie weisen neben CD11b, CD14, CD33, ICAM-1 und MHC Klasse II-Molekülen eine starke Expression von CD68 auf. Sie dienen hauptsächlich dazu, störende Faktoren wie Zelltrümmer, tote Zellen oder eindringende Organismen wie Viren oder Bakterien im Gelenk zu beseitigen (Gulko et al., 2000). Das gesunde Gelenk besteht zu etwa 15 % der gesamten Zellmenge aus Makrophagen. Im rheumatischen Gewebe bewirken sie im hohen Maße eine Verstärkung der entzündlichen Vorgänge in der Deckzellschicht der RA, was bis zu einer Chronifizierung der Entzündungsreaktion beitragen kann (Fujii et al., 1988; Burmester et al., 1997).

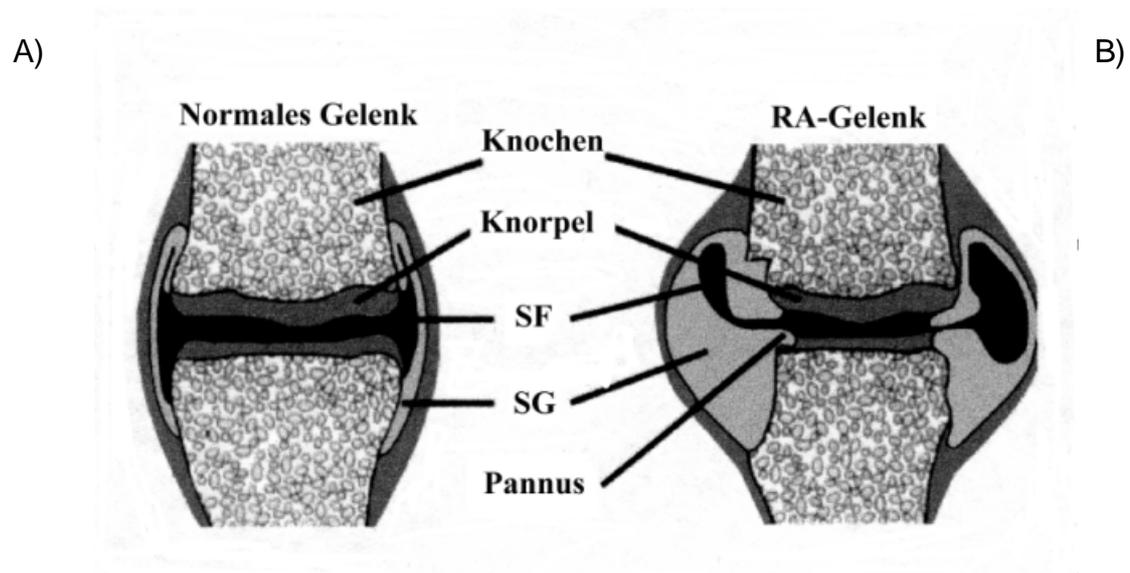
1.2 Das Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis

Die rheumatoide Arthritis ist eine der häufigsten chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen, die durch eine progressive Destruktion der betroffenen Gelenke charakterisiert ist. Am häufigsten sind Kniegelenke und Gelenke der Hand betroffen. Zusätzlich können extraartikuläre Strukturen wie Sehnen, Sehnenscheiden und Gefäße beteiligt sein.

Die bei Patienten mit aktiver rheumatoider Arthritis beobachteten pathologischen Veränderungen des Gelenks lassen sich durch drei Phänomene beschreiben: Synoviale Hyperplasie, Entzündung und abnormale humorale und zelluläre Immunreaktionen (Gay et al., 1993). Dies manifestiert sich in einem hypertrophischen und ödematösen Synovium mit einer proliferierenden Grenzzellschicht und der

typischen Pannusbildung: eine gefäßreiche, entzündlich-reaktive Bindegewebsstruktur entsteht (Abbildung 1). Zusätzlich liegt im Gelenk vermehrt Synovialflüssigkeit mit verminderter Viskosität vor, die verstärkt Neutrophile und Makrophagen enthält, wobei die Neutrophilen jedoch kaum in das Synovium einwandern (Mohr et al., 1975; Fassbender, 1983; Zvaifler et al., 1994).

Abbildung 1: A) Schematische Darstellung eines gesunden Gelenksitus und B) eines Gelenks mit hyperplastischem Synovium mit Pannusbildung und Gelenkdestruktion



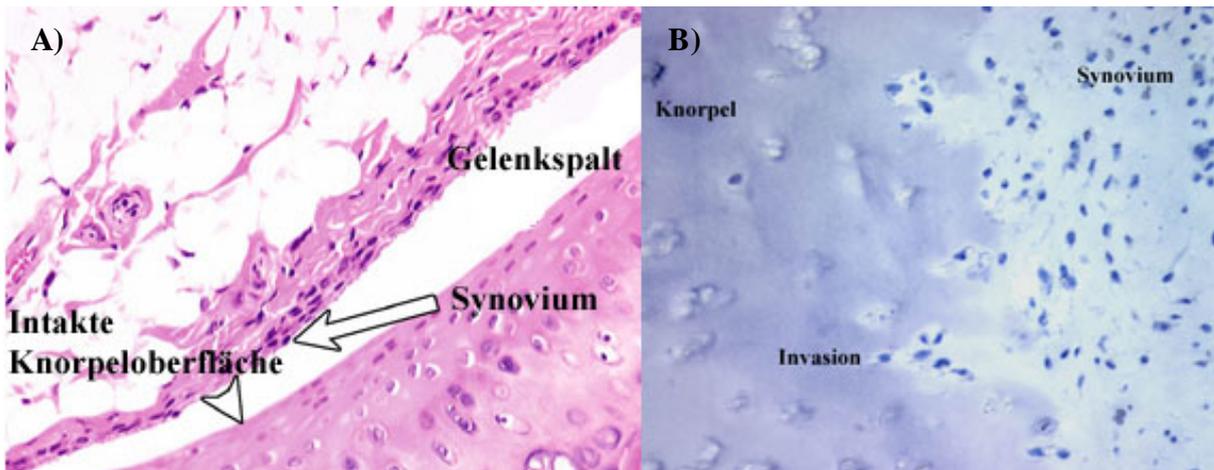
(SF = Synovialflüssigkeit, SG = Synovialgewebe)

Durch diese Vorgänge erscheint das Gelenk von Patienten mit RA stark verdickt und deformiert mit knotenartigen Strukturen. Die betroffenen Gelenke sind in ihrer Mobilität stark eingeschränkt, was zu einer kompletten Versteifung des Gelenks führen kann.

1.2.1 Synoviale Hyperplasie und Knorpeldestruktion

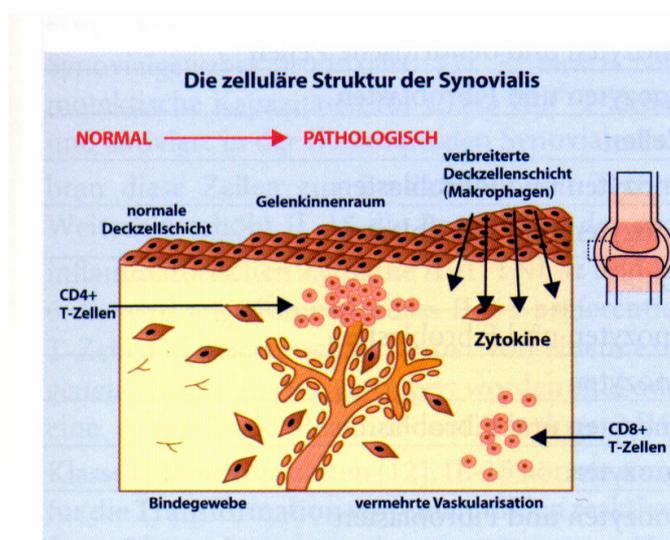
Eines der Hauptcharakteristika der RA ist die synoviale Hyperplasie. Diese ist durch eine Einwanderung von aus dem Knochenmark stammenden Monozyten aus dem Blutkreislauf, sowie durch eine lokale Proliferation von synovialen Fibroblasten v.a. in der Deckzellschicht bereits im frühen Stadium der RA charakterisiert, die in RA bedeutend stärker als in OA ausgeprägt ist (Tak et al., 1997). Die Deckzellschicht des Synoviums, die an den Synovialspalt angrenzt, besteht in der RA aus wesentlich mehr Zellschichten als im normalen Gelenk (s. Abbildung 2).

Abbildung 2: Normale Deckzellschicht (A), synoviale Hyperplasie der Deckzellschicht (B)



Die Pannusbildung und Knorpeldestruktion beginnt bei der RA zunächst mit einer Proliferation von Zellen der synovialen Deckzellschicht und bedingt die Teilnahme aller im Synovium ortsständigen und aus dem Blutkreislauf eingewanderten Zellen (Zvaifler et al., 1994). Das veränderte Synovium weist T-Zellen, Plasmazellen, B-Zellen, Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen, Mastzellen, NK-Zellen und dendritische Zellen im „Sublining“ und Fibroblasten sowie Makrophagen in der Deckzellschicht auf (Graabaek, 1982; Edwards J.C.W., 1987; Zvaifler et al., 1997). Die Einwanderung von Zellen aus dem Blut wird v.a. durch eine erhöhte Vaskularisierung des Synoviums ermöglicht (Paleolog, 1996). Nach Anheftung der Zellen der Deckzellschicht an den Gelenkknorpel invadieren diese das Knorpelgewebe. Ein Pannus entsteht, der am Knorpel anliegt und die darunter liegende Knorpelmatrix angreift (s. Abbildung 3). Ist der Knorpel destruiert, wird der Knochen ebenfalls angegriffen (Fassbender, 1983; Zvaifler et al., 1994).

Abbildung 3: Rheumatoide Arthritis: Schema der progressiven Destruktion eines Gelenks



Besonders bemerkenswert bei diesem Prozeß ist, daß die Proliferation und Invasion dieser Zellen im Anfangsstadium durch die Abwesenheit von Entzündungszellen einschließlich der T-Lymphozyten gekennzeichnet ist. Sowohl Makrophagen als auch synoviale Fibroblasten der Deckzellschicht bei Patienten mit RA weisen einen aktivierten Phänotyp auf, der durch eine verlängerte Lebensdauer, evtl. bedingt durch eine verringerte Apoptose, sowie durch eine erhöhte Zytokinproduktion dieser Zellen beschrieben werden kann (s. I.1.2.1.3; I.1.2.2). Zusätzlich deuten ein erhöhter Glukosestoffwechsel, eine erhöhte Produktion von MMP (Matrix-Metalloproteinasen) und Adhäsionsmolekülen, eine gesteigerte Proliferation und eine erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen auf den aktivierten Phänotyp von synovialen RA-Fibroblasten hin (Werb et al., 1977; Castor et al., 1977; Bucala et al., 1991).

1.2.1.1 Mediatoren der Gelenkdestruktion

Die progressive Gelenkdestruktion wird von Matrix-abbauenden Proteasen durch T-Zell-abhängige sowie T-Zell-unabhängige Stoffwechselwege vermittelt (Gay et al., 1993). Eine zentrale Rolle spielen hierbei Matrix-Metalloproteinasen (MMP), eine Familie, die inzwischen mehr als 10 Mitglieder umfaßt.

MMP-1, auch Kollagenase-1 genannt, spaltet beispielsweise spezifische Strukturen der Tripelhelix der interstitiellen Kollagen Typen I, II und III (Birkedal-Hansen et al., 1993). Die Hemmung von MMP-1 erfolgt hauptsächlich durch TIMP, welches in geringeren Mengen als MMP-1 im RA-Synovium produziert wird (Krane et al., 1990; Firestein et al., 1992). Die Aktivität von MMP wird durch Wachstumsfaktoren und Zytokine reguliert, z.B. wirken IL-1, TNF- α und PDGF stimulierend auf die Transkription von MMP, hemmend wirken z.B. IL-10 und IL-4 (Birkedal-Hansen, 1995). In Anhang 1 sind MMP zusammengefaßt, für die eine Relevanz für die Pathogenese der RA diskutiert wird.

Neben Fibroblasten und Makrophagen tragen Chondrozyten nach Stimulierung durch z.B. IL-1 selbst zur MMP-Synthese und -Freisetzung und somit zur Knorpeldestruktion bei (Moldovan et al., 1997).

Die Kathepsine (Cysteinproteinasen) B, D und L, welche ebenfalls im RA Synovium exprimiert werden, besitzen ein hohes destruktives Wirkungsspektrum durch Abbau von Kollagen Typ II, IX und XI und Proteoglykanen (Maciewicz et al., 1990; Trabandt et al., 1991).

1.2.1.2 Mediatoren der Anheftung von Synoviozyten an den Knorpel

Adhäsionsmoleküle sind vermutlich an der Anlagerung der synovialen Grenzschicht an den Knorpel und somit an der Pannusbildung beteiligt. V.a. Zellen an der Pannus-Knorpel-Grenze, insbesondere synoviale Fibroblasten, weisen eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1, -3, Integrine und CD44 auf (Morales-Ducret et al., 1992; Wicks et al., 1992; Edwards et al., 1994; El Gabalawy et al., 1996; Müller-Ladner et al., 1997a).

1.2.1.3 Verstärkte Proliferation und Zellaktivierung in der synovialen Deckzellschicht

Synoviale Fibroblasten der Deckzellschicht von Patienten mit RA können über mehrere Passagen kultiviert werden. Diese Zellen weisen eine veränderte Expression bezüglich verschiedener Proto-Onkogene und Tumor-Suppressor-Gene, sowie von Genen, die in die Regulation des Zellzyklus eingreifen, auf.

In der RA sind Proto-Onkogene v.a. an der Zellaktivierung und -proliferation beteiligt. Der Begriff „Onkogen“, der aus der Onkologie stammt, bedeutet hierbei nicht Malignität, sondern dient als Marker erhöhter Proliferation und des metabolisch aktivierten Phänotyps transformiert erscheinender synovialer Zellen (Aicher et al., 1994; Morita et al., 1998). Proto-Onkogene, die wichtige Funktionen in der Entwicklungsbiologie besitzen, können durch bestimmte Stimuli oder Mutationen pathologisch werden. Mehrere Proto-Onkogene, wie z.B. *ras*, *fos*, *jun*, *egr-1* und *myc* werden in knorpelnahen synovialen Fibroblasten vermehrt exprimiert (Trabandt et al., 1992a). Fos und jun sind zusammen mit *egr-1* an der Regulation von Kollagenasen (Trabandt et al., 1992b) und der Transkription von IL-1, IL-6 und TNF beteiligt und bilden zusammen den AP-1-Komplex (Aktivator-Protein-1), einen Transkriptionsfaktor, der als wichtiger therapeutischer Ansatzpunkt für die RA angesehen wird und dessen Relevanz ebenso wie die des Transkriptionsfaktors NF- κ B zur Zeit für die RA analysiert wird (Muegge et al., 1989; Dooley et al., 1996; Crofford et al., 1997). Ras und myc konnten direkt in den am Knorpel anliegenden synovialen Fibroblasten zusammen mit den sauren Proteasen Kathepsin B und L sowie mit Kollagenasen nachgewiesen werden (Trabandt et al., 1990). Egr-1 reguliert die Transkription von *ras* und *sis* und wird selbst durch p53 reguliert (Aicher et al., 1994).

Tumor-Suppressor-Gene werden ebenfalls in Bezug zur RA gesetzt. Beispielsweise wurden bereits Mutationsanalysen für *p53* durchgeführt (Firestein et al., 1996; Firestein et al., 1997). Mutationen in Tumor-Suppressor-Genen könnten möglicherweise mit einer verstärkten Proliferation oder verlängerten Lebensdauer synovialer Fibroblasten einhergehen, was eine längere Expression von MMP an der Abbauzone von Knorpel und Knochen bewirken würde. So wird z.B. auch das anti-apoptotisch wirkende Sentrin-1 durch die den Knorpel invadierenden Zellen vermehrt exprimiert (Franz et al., 2000). Auch die Tatsache, daß sehr wenige apoptotische Zellen im Synovium von Patienten mit RA nachgewiesen werden konnten, weist auf eine gestörte Apoptose hin (Nakajima et al., 1995; Matsumoto et al., 1996).

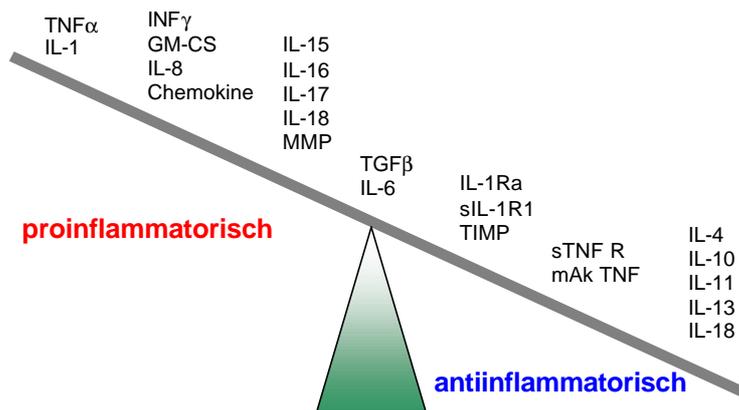
Hinzu kommt die erhöhte Synthese verschiedener Wachstumsfaktoren wie z.B. FGF, EGF, PDGF, IGF, GM-CSF und M-CSF (Kumkumian et al., 1989; Allen et al., 1990). Diese konnten im RA Synovium vermehrt nachgewiesen werden, wobei jedoch keiner spezifisch für die RA ist (Alvaro-Gracia et al., 1991; Reuterdahl et al., 1991; Nakashima et al., 1994; Keyszer et al., 1995).

1.2.2 Entzündung

Zytokine vermitteln die Kommunikation zwischen Zellen. Die Einteilung der Zytokine erfolgt hinsichtlich ihrer Hauptaufgabe, wobei jedes Zytokin jedoch in mehr als einer dieser Kategorien wirksam sein kann: Wachstum, Differenzierung, Immunregulation, Entzündungsvermittlung und -hemmung, Hämatopoese und Chemotaxis. In der RA sind v.a. synoviale Fibroblasten, Makrophagen und in geringerem Maße T-Zellen an der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen beteiligt. Von dieser Vielzahl an Zytokinen werden IL-1 α , -1 β , -6 und TNF α als die wichtigsten proinflammatorischen Zytokine in der RA angesehen und als Ansatzpunkt für neue Therapiestrategien in Betracht gezogen (Taylor, 1994; Maini et al., 1994a; Arend et al., 1995; van de Loo et al., 1995). Hierbei stehen Agenzien im Mittelpunkt, welche die Sekretion dieser Zytokine, bzw. ihre Bindungskapazität an Zelloberflächen-Rezeptoren inhibieren. Mittels Zytokin-spezifischer Antikörper (Ak), löslicher Rezeptoren und Rezeptor-antagonisten wird versucht, die inflammatorische Wirkung dieser Schlüsselzytokine des entzündlichen Prozesses zu unterdrücken (Elliott et al., 1994). Die Zytokine in der rheumatoiden Synovialmembran bilden ein Netzwerk überlappender, synergistischer, antagonistischer und inhibitorischer Aktivitäten, charakterisiert durch eine erhöhte Produktion entzündlich wirkender Zytokine (Anhang 2; (Westacott et al.,

1990; Firestein et al., 1990a; Farahat et al., 1993). Die Entzündung der betroffenen Gelenke kann sich bis in das anliegende Bindegewebe und die Muskulatur ausweiten. Die Balance zwischen den verschiedenen vorhandenen Faktoren ist hierbei ausschlaggebend (Arend, 1993; Moreland et al., 1996).

Abbildung 4: Gestörte Zytokinbalance in der RA



IL-1 und TNF α sind zentrale Zytokine in der Pathogenese der RA (Arend et al., 1995). Sie stehen daher im Mittelpunkt aktueller Untersuchungen und klinischer Studien, wobei TNF α -Hemmer bereits als Medikament eingesetzt werden (Lipsky et al., 2000; Kalden, 2001). Da jedes dieser Zytokine neben proinflammatorischen Eigenschaften auch andere Funktionen wahrnehmen kann, müssen jedoch die Wirkungen und Nebenwirkungen der antiinflammatorischen Therapie genau untersucht werden. So stimuliert z.B. IL-1 Chondrozyten zur Freisetzung von degradierenden Enzymen (Dingle, 1979). Daher ist es von Bedeutung, molekulare Wirkungsmechanismen dieser Zytokine aufzuklären und zu analysieren, in welche Stoffwechselwege bei einer Zytokinhemmung eingegriffen wird. Nicht nur eine entzündungshemmende oder knorpelprotektive Wirkung könnte erzielt werden, möglicherweise würden auch unerwünschte Reaktionen im Gelenk und im Gesamtorganismus durch Zytokininhibierung bewirkt.

1.2.2.1 Akkumulation von Entzündungszellen

In die Akkumulation von Entzündungszellen sind vermutlich verschiedene Chemokine, wie IL-15, IL-16, RANTES und MIP-1 β („macrophage inflammatory protein-1 β “) involviert (s. Anhang 2). Ermöglicht wird der Übergang vom Blut durch das

Gefäßendothel in das Synovium mittels Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1, ICAM-3 und Selektinen wie L-Selektin (ELAM-1, „endothelial leucocyte adhesion molecule“-1) (Hale et al., 1989; Hakkert et al., 1991; Szekanecz et al., 1994; El Gabalawy et al., 1996). Bindungspartner sind u.a. T-Zellen über LFA-1 („leukocyte function antigen“-1). Zunächst adhären die Zellen aus dem Blut an Endothelzellen des Blutgefäßes, treten durch das Endothel hindurch, wandern in die entsprechende entzündete Region und werden zu Effektorzellen aktiviert. Die Migration von Entzündungszellen in das Synovium ist in der RA deutlich stärker ausgeprägt als in der OA (Jones et al., 1991). Eine erhöhte Vaskularisierung des Synoviums erleichtert den Übergang von Entzündungszellen aus dem Blut (Paleolog, 1996).

1.3 Klassifizierung der RA

Die derzeit geltenden Kriterien zur Klassifizierung der RA basieren auf der 1987 aufgestellten Einteilung des „American College of Rheumatology“ (Arnett et al., 1988). 4 der 7 in Tabelle 1 aufgelisteten Kriterien müssen erfüllt sein, wobei die Kriterien 1-4 für mindestens 6 Wochen Bestand haben müssen.

Tabelle 1: Diagnosekriterien der RA.

1.	Morgensteifigkeit von mindestens 1 Stunde Dauer
2.	Arthritis in 3 oder mehreren Gelenken
3.	Arthritis der Handgelenke
4.	Symmetrische Arthritis
5.	Rheumaknoten
6.	Rheumafaktor im Serum
7.	Radiologische Veränderungen, d.h. Erosionen/Osteoporose an den betroffenen Gelenken

Diese Kriterien besitzen eine Sensitivität und Spezifität von ca. 90 %, angewandt auf die mitteleuropäische bzw. nordamerikanische Bevölkerung.

1.4 Theorien zur Entstehung der RA

Da die rheumatoide Arthritis als chronisch entzündliche Gelenkerkrankung durch Entzündung und abnormale humorale und zelluläre Immunreaktion, sowie durch synoviale Hyperplasie beschrieben werden kann, entstanden im Laufe der Erforschung der RA entsprechende Theorien zur Entstehung der RA.

- A) Immunkomplexmodell: Zunächst entstand die Hypothese der Antigen-Antikörper-Reaktion als zentraler Mechanismus, wobei die Gelenkdestruktion mit persistierender Entzündung durch Autoantikörper gegen spezifische Antigene vermittelt wird. Dies basiert auf der Beobachtung abnormaler humoraler Immunreaktionen mit gesteigerter Produktion von Autoantikörpern, wie Rheumafaktoren und Ak gegen Knorpelkollagen Typ II (Zvaifler, 1996). Es wurde jedoch ersichtlich, daß die Pathogenese der RA weitaus komplexer ist. Vermutlich ist diese Autoimmunreaktion sekundär durch Knorpel- und Knochenabbau-Prozesse bedingt. Durch den Abbau werden verschiedene Autoantigene in hohem Maße freigesetzt, wodurch es über APZ zur Autoantigen-Präsentierung kommen könnte. Autoimmunität könnte somit eine Rolle in der Chronifizierung und Progression der RA spielen. Die Theorie, daß Autoantikörper ausschlaggebend für die Initiierung der RA sind, wird inzwischen nicht mehr favorisiert.
- B) T-Zell abhängige Mechanismen als Ursache der RA: Diese Hypothese basiert auf primär T-Zell- und nicht antigenabhängigen Mechanismen. Eine signifikante Häufung eines „shared epitope“, einer Aminosäuresequenz in der β -Kette des HLA-DR4- und -DR1-Komplexes auf APZ des RA-Synoviums (Stastny, 1978; Firestein et al., 1991) und das signifikant häufigere Auftreten von HLA-DRB1*0401 in Patienten mit aggressivem klinischen Verlauf (MacGregor et al., 1995) sprechen für die Beteiligung von T-Zellen an der Genese der RA, wobei diese Häufung jedoch nur für Patienten kaukasischen Ursprungs gilt. Hierbei würde mittels oben beschriebener Moleküle ein bisher unbekanntes Antigen $CD4^+$ T-Helferzellen präsentiert. Diese Theorie wurde durch die große Anzahl von v.a. $CD4^+$ T-Zellen im entzündlich veränderten Synovium gestärkt (Konttinen et al., 1981; Meijer et al., 1982). Seither wird nach RA-spezifischen T-Zell-Klonen gesucht, die bis heute jedoch nicht identifiziert werden konnten. Die genaue Beteiligung dieser T-Zell-abhängigen zellulären Immunreaktionen in der Pathogenese der RA ist jedoch bisher noch ungeklärt.
- C) Synoviozyten als Ursache der RA: Diese Theorie basiert auf der Beobachtung, daß die Deckzellschicht weitgehend T-Zell frei ist. Zusätzlich gibt es vermehrt Hinweise, daß transformiert erscheinende synoviale Fibroblasten, die an der Invasionszone des Synovialgewebes in den benachbarten Gelenknorpel und -knochen zu finden sind, entscheidend an der Zerstörung des Gelenks beteiligt

sind (Fassbender, 1983; Müller-Ladner et al., 1998). Diese Theorie wird durch die ausgeprägte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen durch Synoviozyten, ein verändertes Wachstumsverhalten *in vitro* und die Fähigkeit an die Knorpelmatrix zu binden und diese aktiv zu zerstören, gestärkt (s. I.1.2.1). Weiterhin konnte mittels des SCID-Maus-Modells der RA gezeigt werden, daß isolierte synoviale RA-Fibroblasten über eine lange Zeitspanne den Knorpel invadieren und zerstören (Geiler et al., 1994; Müller-Ladner et al., 1996). Synoviale Fibroblasten sind außerdem in der Lage, Osteoklasten zu stimulieren und weisen einen Schutz vor programmiertem Zelltod (Apoptose) auf, wodurch sie ihr invasives Verhalten dauerhaft fortsetzen können (Franz et al., 2000; Shigeyama et al., 2000).

Stellt man die beiden letzten Theorien in Zusammenhang, könnte folgender Ablauf der Erkrankung postuliert werden:

Durch bisher unbekannte Stimuli, evtl. mit genetischer Prädisposition, kommt es zu einer Aktivierung des Synoviums einschließlich Gefäß-permeabilisierender Veränderungen. Von synovialen Makrophagen und Fibroblasten produzierte Zytokine führen zu einer ersten entzündlichen Reaktion, welche nachfolgend zu einer Anreicherung von proinflammatorischen Zellen, v.a. T-Zellen, führt. Durch Degradationsprozesse des Knorpels und Zelltod kommt es verstärkt zur Präsentation von Antigenen mittels APZ und somit zur Aktivierung und klonalen Expansion von T-Zellen, wobei hier MHC Klasse II Moleküle eine besondere Rolle spielen könnten (Ikeda et al., 1996). So könnte ein Milieu entstehen, in dem inhibitorische Mechanismen (z.B. antiinflammatorische Zytokine) nicht mehr dem Entzündungsprozeß entgegenwirken können. Dies resultiert in einem irreversiblen Prozeß, der sowohl T-Zell-dominiert mit akuten, entzündlichen Verläufen oder Schüben als auch Deckzellschicht-dominiert mit fortschreitender Gelenkdestruktion mit nur mäßiger Entzündung verlaufen kann. Letztlich kommt es zu einer entzündungsunabhängigen Progression der Gelenkdestruktion durch das invasiv wachsende Synovialgewebe.

Die molekularen Ursachen, welche in die morphologischen und physiologischen Veränderungen der jeweiligen Zellpopulationen involviert sein können, sind bisher nicht bekannt. Es wird vermutet, daß die Ursachen, die zur RA führen, sowohl genetische Prädisposition, z.B. mittels MHC-Restriktion, als auch umweltbedingte Ursachen, wie z.B. infektiöse Manifestationen, beinhalten können (Wilder, 1994;

Ollier et al., 1995). Aus diesen Gründen wird von der RA als einer multifaktoriellen Erkrankung gesprochen.

1.5 Genterapeutische Ansätze bei der RA

Trotz Verbesserungen in der Behandlung der RA, v.a. durch Einsatz von Methotrexat (MTX) allein oder in Kombination mit anderen Basistherapeutika, besteht eine dringende Notwendigkeit für die betroffenen Patienten, neue Wege in Diagnostik und Therapie dieser Erkrankung zu finden, um möglichst früh bei Krankheitsbeginn differentialdiagnostisch und –therapeutisch die bestmögliche Hilfe zu erhalten.

Zur Zeit werden verschiedene Versuchsansätze diesbezüglich untersucht. So werden Mechanismen im Bereich der Adhäsion, Transformation sowie Aktivatoren der Destruktion und Entzündungsmediatoren für genterapeutische Zwecke untersucht, wie z.B.:

Adhäsionsmoleküle:	VCAM-1, ICAM, CS-1, Osteopontin
Chemokine:	SDF-1, MCP-1
Aktivierung:	PTEN, p53, p33, Proto-Onkogene, z. B. CENP-E
Entzündung:	IL-1, IL-10, TNF α
Destruktion:	IL-1, IL-10, MMPs, TIMP, Kathepsine

Von besonderem Interesse waren für diese Arbeit TNF α - und IL-1-Hemmung sowie IL-10:

A) TNF α wird von vielen Zellen im Synovium inklusive der Knorpel/Pannus-Region exprimiert und von den meisten synovialen Zellen wie Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten synthetisiert (Saxne et al., 1988; Chu et al., 1991). Die Präsenz der TNF α -Rezeptoren (TNFR) p55 und p75 (Typ I und II) im RA Synovium wurde nachgewiesen und stützt die Hypothese, daß das Ungleichgewicht zwischen TNF α und löslichen TNF α -Rezeptoren zur Entzündung in der RA beiträgt (Saxne et al., 1988; Cope et al., 1992). Lösliche TNF α -Rezeptoren sind in der Lage, TNF α zu binden, so daß es nicht mit zellulären TNF α -Rezeptoren interagieren kann. TNF α induziert die Synthese von Kollagenasen durch synoviale Zellen, trägt zur Akkumulation von Entzündungszellen durch gesteigerte Adhäsion von Neutrophilen und Leukozyten an Endothelzellen bei und erhöht die synoviale Proliferation, ein Prozeß der durch die Aktivierung von NF κ B in Synoviozyten vermittelt wird (Fujisawa et al., 1996;

Miagkov et al., 1998). Durch weitere $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Ereignisse wie der Hochregulierung und Sekretion proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-1, IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ selbst) sowie durch Aktivierung und Aufrechterhaltung der T-Zell-Proliferation, entsteht eine chronische, nicht regulierbare Entzündung. Antiinflammatorische Zytokine wie IL-1Ra, löslicher p55 und p75 TNFR sind zwar vorhanden, das Gleichgewicht liegt jedoch auf Seiten der proinflammatorischen Zytokine (Charles et al., 1999). Diese Beobachtungen stimmen mit der Vermutung überein, daß Therapien, welche die Aktivitäten mehrerer inflammatorischer Effektoren modifizieren, am effektivsten wären. Viele Studien analysierten die Effekte der Blockade von $\text{TNF}\alpha$ in Tiermodellen und auch klinische Studien wurden bereits durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, daß $\text{TNF}\alpha$ -Inhibierung signifikant Schwellung und Entzündung im Tiermodell reduzieren kann, jedoch auch die IL-6-Synthese stimuliert (Williams et al., 1992; Elliott et al., 1993; Moreland et al., 1997; Kim et al., 2000). Experimente, die die endogene $\text{TNF}\alpha$ -Produktion inhibierten, zeigten, daß systemische Gabe von blockierenden $\text{TNF}\alpha$ -Ak oder löslichen TNFR nach Krankheitsbeginn zu einer Verbesserung in der murinen kollageninduzierten Arthritis führten (Elliott et al., 1993; Maini et al., 1994b). Man kam zu der Erkenntnis, daß $\text{TNF}\alpha$ eines der wichtigsten therapeutischen Ziele der RA ist, und dies wiederum führte zum Beginn mehrerer klinischer Studien. Die Gabe von anti- $\text{TNF}\alpha$ -mAk an RA Patienten schien die Krankheitsaktivität über einen Zeitraum von 8 Wochen zu reduzieren, jedoch waren zwei- bis vierwöchentliche Injektionen notwendig, denn die arthritischen Symptome traten nach Absetzen der Injektionen rasch wieder auf (Elliott et al., 1993; Maini et al., 1994b; Moreland et al., 1997). Ak gegen $\text{TNF}\alpha$ hatten auch nahezu keinen Effekt bei weit fortgeschrittener Erkrankung (Williams et al., 1992; Kim et al., 2000). Daher ist die Optimierung einer anti- $\text{TNF}\alpha$ -Therapie wegen der vielfältigen Funktionen von $\text{TNF}\alpha$ dringlich erforderlich sowie die Aufklärung der molekularen Mechanismen nach $\text{TNF}\alpha$ -Inhibierung.

- B) IL-1: Wie bereits erwähnt, ist IL-1 gemeinsam mit $\text{TNF}\alpha$ ein Initiator der Entzündung in der RA und teilt viele Eigenschaften mit $\text{TNF}\alpha$. Durch Gabe des humanen IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) wird versucht, die Wirkung von IL-1 zu unterdrücken. IL-1Ra bindet an Typ I und II Rezeptoren auf der Zelloberfläche und inhibiert komplett die Bindung von IL-1 α und β an ihre Rezeptoren. Hierbei

ist jedoch eine ca. 100fach höhere Konzentration von IL-1Ra als IL-1 erforderlich, eine Menge, die nicht erreicht wird, obwohl IL-1Ra im RA Synovium vorliegt (Arend et al., 1994). Es wurden bereits mehrere klinische Studien mit IL-1Ra durchgeführt, die signifikante, jedoch moderate Verbesserungen in Krankheitsaktivität und Knorpelerosion ergaben. So konnten Progressionsrate und Knorpeldestruktion reduziert, sowie die Entzündungsaktivität unterdrückt werden (Campion et al., 1996; Roux-Lombard et al., 2001; Watt et al., 2001; Bresnihan, 2001). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß sowohl die Gabe von IL-1Ra als auch IL-10 verschiedene Aspekte der Knorpeldestruktion im SCID-Maus-Modell der RA inhibieren kann (Müller-Ladner et al., 1997b; Müller-Ladner et al., 1999). Neuere Studien bestätigten die protektiven Effekte im *ex vivo* Gentransfer von IL-1Ra in humane synoviale RA-Fibroblasten (Gabay et al., 2001; Evans et al., 2001), daher lag es nahe, daß doppelter Gentransfer von IL-1Ra und IL-10, vorteilhafte Ergebnisse bezüglich Knorpelprotektion erbringen könnte.

- C) Neben Inhibierung von proinflammatorischen Zytokinen werden auch hemmende Zytokine, wie IL-10, IL-13 und TGF- β , welche die Produktion von entzündlich wirkenden Zytokinen unterdrücken, analysiert. Sie liegen in hoher Menge im RA-Synovium vor, jedoch anscheinend nicht in ausreichenden Mengen, um der Entzündung entgegenzuwirken (Miossec et al., 1990; Katsikis et al., 1994; Isomaki et al., 1996). Eines dieser Zytokine, IL-10, ist von speziellem Interesse als mögliches therapeutisches Agens für die RA. IL-10 ist ein homodimeres 35 kDa Zytokin mit immunosuppressiven und knorpelprotektiven Eigenschaften (Lacraz et al., 1995), besitzt aber auch immunstimulatorisches Potential, abhängig von der Zielzelle (Go et al., 1990; MacNeil et al., 1990). Allerdings fehlen zur Zeit adäquate klinische Studien mit IL-10 zur Behandlung von RA, um diese Ergebnisse zu bestätigen. Das humane IL-10 besitzt 84 % homologe Proteinsequenzen mit dem viralen IL-10, einem Protein, welches vom Epstein-Barr Virus synthetisiert wird. Die meisten Divergenzen liegen hierbei in den NH₂-terminalen Aminosäuren (Moore et al., 1990). vIL-10 besitzt die immunosuppressiven Eigenschaften von humanem und murinem IL-10, ihm fehlen jedoch die immunstimulatorischen, einschließlich T-Zell-stimulatorischen, Eigenschaften (Moore et al., 1990; de Waal et al., 1991).

Weder durch Hemmung noch durch Überexpression eines dieser Zytokine allein konnte jedoch bisher die fortschreitende Entzündung und Knorpeldestruktion bei der

RA vollständig zum Stillstand gebracht werden. Daher sind Kombinationstherapien zur Zeit von großem Interesse.

Keiner dieser Versuchsansätze mittels Überexpression protektiver Zytokine oder Hemmung destruktiver Moleküle konnte jedoch sowohl die Entzündung als auch die Gelenkdestruktion in verschiedenen Tiermodellen oder *in vitro* Experimenten komplett inhibieren (s. I.1.2.2). Daher sind weitere Versuchsansätze in dieser Richtung notwendig. Zwar stehen mehrere neue Substanzen und Moleküle zur Hemmung von gelenkdestruktiven Stoffwechselwegen zur Verfügung, diese können jedoch nicht eingesetzt werden, da keine geeigneten Verfahren existieren, um sie am Ort der Entzündung, der Invasionszone des aggressiven Synovialgewebes in den Knorpel und Knochen, zu applizieren. Labile, rasch abgebaute Proteine müßten daher regelmäßig intraartikulär appliziert werden. Durch raschen Lymphabtransport aus dem Gelenk wären jedoch hohe Dosen notwendig (s. I.1.2.2). Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, wäre die lokale Produktion solcher Moleküle durch körpereigene Zellen. Dies könnte erreicht werden, indem das Gen in synoviale Zielzellen mittels eines Vektors eingebracht und so in körpereigenen Zellen überexprimiert würde. Voraussetzung für eine Anwendung beim Menschen ist daher die Prüfung eines solchen Gentransfers an geeigneten Modellen.

II. FRAGESTELLUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse gentherapeutischer Ansätze für die RA anhand des SCID Maus Modells. Die hierzu verwendete experimentelle Strategie sollte zwei wesentliche Punkte ansprechen, zum einen die komplette Simulation einer Gentherapie unter Verwendung von viralen Vektoren in einem dem humanen Gelenk möglichst nahestehenden Modell und zum anderen die Untersuchung der molekularen Effekte einer solchen gelenkprotektiven Gentherapie und deren Integration in die aktuelle Pathophysiologie der Erkrankung. Zielmoleküle waren die an der Spitze der proinflammatorischen Antwort stehenden Zytokine, insbesondere da "biologische" Inhibitoren bereits in klinischen Studien oder als Therapeutikum eingesetzt werden, obwohl noch wenig über die molekularen und histopathologischen Effekte z.B. nach TNF α - und IL-1-Hemmung oder nach Überexpression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 bekannt ist. Um die Zusammenhänge zwischen molekularen Veränderungen und potentieller Gelenkprotektion nach Gentransfer mit demselben Gewebematerial von RA-Patienten zu untersuchen, mußten jedoch zunächst geeignete Methoden sowohl molekularbiologisch als auch histologisch etabliert werden. Daher ergaben sich insgesamt folgende Problemstellungen, die es zu lösen galt:

1. Etablierung einer geeigneten Methode zur Analyse der differentiellen Genexpression mit geringen Mengen an RNA, da synoviale Fibroblasten nur über eine limitierte Anzahl von Passagen kultiviert werden können und somit nur wenig RNA zur Verfügung steht.
2. Etablierung eines viralen *in vitro* und *in vivo* Gentransfers von Zytokinhemmern bzw. von Zytokinen, insbesondere TNF RI, IL-1Ra und IL-10, in synoviale RA-Fibroblasten mit einer konstanten Genexpression über den gesamten Versuchszeitraum unter Ausschluß von viral vermittelten Nebeneffekten.
3. Untersuchung der molekularen Veränderungen nach TNF α - und IL-1-Hemmung bzw. IL-10 Überexpression in verschiedenen Kombinationen (Einzel-, Doppel-, und Dreifachgentransfer) mittels der neu etablierten molekularbiologischen Methoden. Die differentielle Genexpression sollte anschließend mittels

zusätzlicher Methoden auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen und bestätigt werden.

4. Analyse der Effekte des Gentransfers bezüglich Knorpeldestruktion parallel zu den molekularen Analysen. Hierbei sollten die protektiven Effekte der verschiedenen Zytokine bzw. -Hemmer miteinander verglichen werden, um die effektivste der getesteten Kombinationen zu ermitteln.

Aus diesen Daten sollten neue Erkenntnisse über potentielle gentherapeutische Zielgene oder Zielgen-Kombinationen für knorpelprotektive Therapien für Patienten mit RA gewonnen werden. Außerdem sollten Hinweise auf die molekularen Wirkungsmechanismen der erzielten Knorpelprotektion gewonnen werden.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Chemikalien und Materialien

Stoffbezeichnung	Bezugsquelle
AFLc-HSA	DKFZ, Heidelberg
$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP	Amersham Pharmacia, Freiburg
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	Amersham Pharmacia, Freiburg
Acrylamid-Bis-Fertiglösung (19:1)	Appligene, Illkirch, F
Acrylase	Stratagene, Amsterdam, NL
Agarose	FMC Bioproducts, Rockland, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Amphotericin B	Bristol-Myers Squibb, München
Ampicillin-trihydrat	Sigma, Deisenhofen
<i>AmpliTaq</i> [®] DNA Polymerase, Stoffel Fragment	Perkin Elmer, Weiterstadt
AMV Reverse Transcriptase	Promega, Mannheim
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
β -Mercaptoethanol	Amresco, Salon, USA
BioMax [™] ML Röntgenfilm	Kodak, Rochester, USA
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA	Sigma, Deisenhofen
Chamber Slides, w/Cover RS Glass Slide	Nunc, Wiesbaden
Ciprofloxacin	Bayer, Leverkusen
DEPC	Sigma, Deisenhofen
Digoxigenin-UTP	Boehringer, Mannheim
Discarit [™] II 2ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Dispase II	Boehringer, Mannheim
DMEM (1 g/l Glukose) Grundmedium	Biochrom KG, Berlin
DMF	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DNase I	Boehringer, Mannheim
DTT	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Bio-Rad, Hercules, USA
Einfrierröhrchen (2 ml)	Corning Costar, Bodenheim
Endo-Frost Pellets	Roeko, Langenau
Eosin	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA, Linz, A
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg
Formalin, 4,5 %ig	Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd, 25 %	Sigma, Deisenhofen

Stoffbezeichnung	Bezugsquelle
Glutaraldehyd, 25 %	Sigma, Deisenhofen
Glyzerin	Sigma, Deisenhofen
Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Hexadimethrin Bromid (Polybrene)	Sigma, Deisenhofen
IL-10, rekombinant, human	R&D Systems, Wiesbaden
IL-1Ra, rekombinant, human	R&D Systems, Wiesbaden
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Isotone NaCl-Lösung, 0,9 % Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ketamin Hydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Liquemin [®] N 25 000	Roche Diagnostics, Mannheim
6-, 12-, 24-, 48-, 96-Loch Platten	Corning Costar, Bodenheim
Luria Broth	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Domspitz, Regensburg
Micro-Fine 12,7mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
MicroAmp [®] Reaction Tubes, 8/12 tubes/stripe	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Microlane [®] 3 sterile Nadeln	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
MspI-pBR 322-Verdau	New England Biolabs, Schwalbach
Natriumpyruvat	Biochrom KG, Berlin
Neu Fuchsin Färbelösung	Dako, Hamburg
Novaminsulfon-Tropfen	Ratiopharm, Ulm
OCT [™] Tissue-Tek [®]	DiaTec, Hallstadt
PBS	PAA, Linz, A
Penicillin/Streptomycin	PAA, Linz, A
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
RNase-Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Seralon [®] blau Ds-12	Serag Wiessner, Naila
SSC, 20x	Sigma, Deisenhofen
SuperFrost [®] Plus Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
TCCP-HSA	DKFZ, Heidelberg
sTNF RI	R&D Systems, Wiesbaden
Trypsin/EDTA	PAA, Linz, A
Vetren 200 (Heparin)	Byk Gulden, Konstanz
Whatman-Papier	Whatman, Biometra, Göttingen
X-Gal	Gibco, Karlsruhe
Xylazin Hydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
Zellkulturflaschen	Corning Costar, Bodenheim

Alle anderen Chemikalien und Materialien wurden von der Firma Merck Eurolab, Darmstadt in *p.a.*-Qualität bezogen. Die Restriktionsenzyme und die entsprechenden Puffer wurden von New England Biolabs, Schwalbach, bezogen.

1.2 Zellen und Organismen

Tabelle 2: Zellen und Organismen

Zelllinie	Herkunft	Bezugsquelle
NHDF-c	normale Hautfibroblasten, human	PromoCell, Heidelberg
HT-29	Kolon, Adenokarzinom, human	American Type Cell Culture (ATCC), Rockville, USA
HT-1080	Fibrosarkom	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig

Virus	Herkunft	Referenz
Adenovirus	Ad5 ($\Delta E1$)	(Zhang et al., 1999)
Adenovirus	Ad5 ($\Delta E1\Delta E3$)	(Lechman et al., 1999)
Retrovirus	mMLV MFG	(Danos et al., 1988; Makarov et al., 1996; Baragi, 2000)

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> TOP 10	<i>F mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7696$ <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>Str^R</i>) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe

1.3 Oligonukleotide

Tabelle 3: Arbiträre Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
OPN 23	CAG GGG CAC C	RT der RAP-PCR
OPN 21	ACC AGG GGC A	RT und PCR der RAP-PCR
US6	GTG GTG ACA G	RAP-PCR
Random Hexamers	Mix	RT (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Tabelle 4: Genspezifische Oligonukleotide

Primer	Sequenz (5' - 3')	T_{ann} MgCl ₂	Produktlänge	Verwendung
18S-f 18S-r	TCA AGA ACG AAA GTC GGA G GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA	54-59 3mM	488 Bp	Realtime-PCR, Quantum, RT-PCR
M13 for M13 rev	CGT TGT AAA ACG ACG GCC AG CAG GAA ACA GCT ATG ACC AT	55	s. III.3.9.1.2	Kontroll-PCR aus Plasmiden
Aktivin_F Aktivin_B	GGA GGG CAG AAA TGA ATG AAC GAG TGG AAG GAC AGT GAG GAC	50 4mM	783 Bp	Quantum
aktivin-F-3 aktivin-R-3	AAA AGA AGG GCG GAG GTG AA TGG AAG GAC AGT GAG GAC CC	59 3mM	297 Bp	Realtime-PCR
axl-for axl-rev	CAG AGG TGC TAA TGG ACA TA CTC TTT CCA CTG TTG GTT CA	52 3mM	317 Bp	Quantum, RT-PCR, Realtime-PCR
C3aR-F C3aR-R	CAG TGT CTT CCT GCT TAC TG AGT GAA TCT GCA GAA GGT CT	54 4mM	401 Bp	Sondenherstellung für <i>in situ</i> Hybridisierung

Primer	Sequenz (5' - 3')	T _{ann} MgCl ₂	Produkt- länge	Verwendung
C5aR-F C5aR-R	CAC GTC CAT TGT ACA GCA TC AAT CGT GAG CGT GAG TAG AG	55 4mM	381 Bp	Sondenherstellung für <i>in situ</i> Hybridisierung
CD82480F CD82840R	CAA CAT GGG CAA GCT GAA GC ATG ATG CCC AGG TTC TCC TG	56 3mM	360 Bp	Quantum, RT-PCR
CD82-2-F CD82-2-R	TAT GTC TTC ATC GGC GTG GG CAT GAG CTC AGC GTT GTC TG	56 3mM	326 Bp	Realtime-PCR, Sondenherstellung
c-myc-for-2 c-myc-rev-2	ACG TTA GCT TCA CCA ACA GG GTC GCA GAT GAA ACT CTG GT	55 5mM	319 Bp	Realtime-PCR
follistatin_F follistatin_B	GTC GGG ATG TTT TCT GTC CAG TGG CAT AAG TGG CAT TGT CAC	50 4mM	374 Bp	Quantum, RT-PCR
follistatin-f follistatin-r	AAA CGT GTG AGA ACG TGG AC TCC GAT TAC AGG TCA CAC AG	55 4mM	305 Bp	Realtime-PCR
inhibin_F inhibin-B	CCC GAG GAA GAG GAG GAT GTC AGT GCT GCG TGA GAA GGT TGG	50 4mM	867 Bp	Quantum, RT-PCR
Inhibin-For Inhibin-Rev	CCC GAG GAA GAG GAG GAT GT GAG CAT GGC CCA AAG ACA TG	55 3mM	297 Bp	Realtime-PCR
L1-for L1-rev	TGG CGA TTC CTC AGGGAT CTA TCC CCA CCT ATG AGT GAG AAT	55 3mM	352 Bp	Realtime-PCR
p38δ-F-2 p38δ-R-2	CCT GTG CAA CTT CTA TGA CT TCT GGT TGT AGT GCA TCC AG	55 4mM	300 Bp	Realtime-PCR
PTEN-F PTEN-R	CAT GAC AGC CAT CAT CAA AG CAG TGA ATT GCT GCA ACA TG	52 4mM	370 Bp	Realtime-PCR

Die genspezifischen Oligonukleotide wurden mit dem Programm „DNAsis 2.5“ (Hitachi Software Engineering Co.) entworfen und mittels BLAST Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) auf ihre Spezifität überprüft (Altschul et al., 1997) und von MWG Biotech, Ebersberg in HPSF-Qualität (high purity salt free) bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in H₂O_{bidest.} gelöst (100 pmol/μl). Die Sequenzen der Oligonukleotide für die RAP-PCR stammen aus dem Labor von M. McClelland, Sidney Kimmel Cancer Center, San Diego, USA. Die Sequenzen der 18S-Primer wurden dem QuantumRNA™ Kit entnommen, die der M13-Primer dem TOPO™ TA Cloning® Kit.

Die in Tabelle 4 aufgeführten Primer sind mit f, F, for bzw. For für vorwärts („forward“) und r, R, rev, bzw. Rev für rückwärts („reverse“) bezüglich der 5'-3'-Orientierung der DNA gekennzeichnet.

1.4 Vektoren und Plasmide

Tabelle 5: Vektoren

Vektor	Referenz
pCR [®] II-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 6: Plasmide

Plasmid	Verwendung
pCD82	<i>in situ</i> Hybridisierung, s. III.2.4.2
pC3aR	<i>in situ</i> Hybridisierung, s. III.2.4.2
pC5aR	<i>in situ</i> Hybridisierung, s. III.2.4.2
pp33ING1	<i>in situ</i> Hybridisierung, s. III.2.4.2

1.5 Antikörper

Tabelle 7: Primärantikörper

Spezifität	Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
β2-Mikroglobulin	Maus anti Human, monoklonal	1:50	Serotec, Eching
CD11b	Maus anti Human, monoklonal	1:50	Immunotech, Krefeld
CD14	Maus anti Human, monoklonal	1:40	Dako, Hamburg
C3a	Maus anti Human, monoklonal	1:10	RDI, Flanders, NJ, USA
C5a	Kaninchen anti Human, monoklonal	1:100	Prof. Dr. S. Barnum, Birmingham CA, USA
CD68	Maus anti Human, monoklonal	1:50	Dako, Hamburg
CD82	Maus anti Human, monoklonal	1:50	Serotec, Eching
CD82	Maus anti Human, monoklonal	1:50	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Collagen IV	Maus anti Human, monoklonal	1:50	Dako, Hamburg
HLA Class I	Ratte anti Human, monoklonal	1:20	Serotec, Eching
I-A	Maus anti Maus/Ratte, monoklonal	1:50	Serotec, Eching
IL-10 Rezeptor	Maus anti Human, monoklonal	1:50	R&D Systems, Wiesbaden
p33ING1	Ziege anti Human, polyklonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
prolyl 4-hydroxylase	Maus anti Human, monoklonal	1:50	Dako, Hamburg
IL-1 Rezeptor	Rat anti Mouse, polyklonal	1:50	W. Falk, Uniklinik Regensburg
Fibroblasten	Maus anti Human, monoklonal	1:50	Dako, Hamburg
Fibroblasten	Maus anti Human, monoklonal	1:500	Sigma, Deisenhofen
MMP-1	Maus anti Human, monoklonal	1:20	R&D Systems, Wiesbaden
MMP-13	Maus anti Human, monoklonal	1:40	R&D Systems, Wiesbaden

Tabelle 8: Sekundärantikörper und Zubehör für Immunhistologie und *in situ* Hybridisierung

Sekundärantikörper/Zubehör	Bezugsquelle
Biotin-konjugierte Ziege anti-Kaninchen Immunglobulin-spezifische polyklonale AK (1:300)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Biotin-konjugierte Ziege anti-Maus Immunglobulin-spezifische polyklonale AK (1:600)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Ziege anti-Ratte IgG:Biotin (1:200)	Serotec, Eching
Ziege anti-Maus, Meerrettichperoxidase gekoppelt	Bio Rad, München
Ziege anti-Kaninchen, Meerrettichperoxidase gekoppelt	Santra Cruz Biotechnology, USA
Meerrettichperoxidase-konjugiertes Streptavidin	Dianova, Hamburg
Gold-AffiniPure Ziege anti-Meerrettichperoxidase	Dianova, Hamburg
<i>anti</i> -Digoxigenin-AP Ak	Boehringer Mannheim, Mannheim
Normales Ziegenserum	Dianova, Hamburg
Normales Mausserum	Dianova, Hamburg
Normales Rattenserum	Dianova, Hamburg
Normales Schafserum	Dianova, Hamburg

1.6 Kits und Standards

Tabelle 9: Verwendete Kits

Kit	Bezugsquelle
1 st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Boehringer, Mannheim
Atlas TM human Apoptosis Array	Clontech, Palo Alto, USA
Atlas TM human Cytokine Array	Clontech, Palo Alto, USA
Atlas TM human Oncogene/ Tumor-suppressor gene Array	Clontech, Palo Alto, USA
β-Gal staining Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler–FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
MAXIscript TM	Ambion, Wiesbaden
Peroxidase Substrate Kit AEC	Vector Laboratories, Grünberg
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick TM Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick TM PCR purification Kit	Qiagen, Hilden
Quantikine human Activin A Colorimetric Sandwich ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine human Follistatin Colorimetric Sandwich ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine human IL-1Ra Colorimetric Sandwich ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine human IL-10 Colorimetric Sandwich ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine M mouse IL-6 Colorimetric Sandwich ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine human IL-6 Colorimetric Sandwich ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine human TNFα/TNFSF2 Colorimetric Sandwich ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine human sTNF RI/TNFRSF1A Colorimetric Sandwich ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
Quantum TM RNA TM 18S Internal Standard	Ambion, Wiesbaden

Kit	Bezugsquelle
RiboGreen™ RNA Quantitation Kit	Molecular Probes, Leiden, NL
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
TOPO™ TA Cloning®	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 10: Standards

Standard	Verwendung	Hersteller
100 bp marker	Agarose-Gelelektrophorese	Gibco, Karlsruhe
500 bp marker	Agarose-Gelelektrophorese	Gibco, Karlsruhe
1 kb marker	Agarose-Gelelektrophorese	Gibco, Karlsruhe

1.7 Geräte

Tabelle 11: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Emax precision microplate reader; Software: Softmax	Molecular Devices, MWG, Ebersberg
LightCycler Instrument	Roche Diagnostics, Mannheim
GeneAmp® PCR System 9700 (Thermocycler)	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Jung Frigocut 2800E	Leica, Nussloch
RP X-OMAT Processor Model M6B	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
Spectra Fluor Plus, Software: Magellan	Tecan, Crailsheim
Storm 860 Phosphorimager	Molecular Dynamics, Freiburg
Vertikale Gelelektrophoresekammer Modell S2	Gibco, Karlsruhe
Mikroskopsystem Leitz DM RBE, Software: Metaview	Leica, Heidelberg

2. Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Asservation der Gewebe

Das Synovialgewebe sowie die daraus isolierten Fibroblasten wurden von insgesamt ca. 200 Patienten mit RA bzw. OA der orthopädischen Universitätsklinik Regensburg in Bad Abbach im Rahmen von Routineoperationen (Synovektomie, Gelenkersatz) asserviert.

Für Implantationsversuche im SCID-Maus-Modell (s. III.2.3) wurde gesunder humaner Knorpel verwendet.

2.1.2 Einfrieren der Synovialgewebe

Das asservierte Synovialgewebe wurde nach der Operation möglichst schnell verarbeitet, um Degradations- und Abbauprozesse im Gewebe, z.B. von RNA und Proteinen, zu minimieren. Der Transport der Gewebe erfolgte möglichst schnell auf Eis. Die primären Verarbeitungszeiten lagen zwischen 15-45 min. Ein Teil des Gewebes wurde umgehend in Gefriermedium (OCT™ Tissue-Tek®) eingebettet und in flüssigem Stickstoff langsam eingefroren. Die Lagerung der Gewebe erfolgte bei -80°C.

2.1.2.1 Kryogewebeschnitte

Zum Anfertigen von Kryogewebeschnitten wurde ein Jung Frigocut 2800E Kryostat verwendet. Die Schnittdicke betrug 5-8 µm bei einer Schneidetemperatur zwischen -20°C bis -28°C. Die Fixierungsvorgänge wurden der jeweiligen Verwendung der Kryogewebeschnitte angepaßt. Für die *in situ* Hybridisierung wurden Gewebeschnitte unter RNase-freien Bedingungen hergestellt.

2.1.3 Isolierung der Fibroblasten aus Synovialgewebe

Ein Teil der asservierten Gewebe wurde zur Isolierung synovialer Fibroblasten verwendet. Ein synoviales Gewebstück wurde manuell in 0,5 mm³ große Stücke zerteilt und eine Stunde bei 37°C in steriler Dispaselösung enzymatisch

aufgearbeitet. Die Zellen wurden bei 1200 upm für 10 min zentrifugiert und mit DMEM gewaschen. Die Zellsuspension wurde in 75 cm² Zellkulturflaschen (ZKF) transferiert und bei 37°C/10 % CO₂ kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, um nicht adhärente Zellen und Gewebereste zu entfernen. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert (s. III.2.1.4.2), passagiert (s. III.2.1.5) und in 75 cm² ZKF ausgesät und weiter kultiviert. Die Kulturen wurden regelmäßig mittels PCR auf Mykoplasmenkontamination überprüft.

2.1.4 Zellkultur

2.1.4.1 Nährmedium

Tabelle 12: Medium für die Zellkultur

DMEM + 10 % FCS		
DMEM (1 g/l Glukose) Grundmedium	500 ml	
FCS	50 ml	10 % (v/v)
HEPES (1 M)	5 ml	1 % (v/v)
Penicillin/Streptomycin	5 ml	1 % (v/v)
Amphotericin B (1 mg/ml)	0,5 ml	0,001 ‰ (w/v)

2.1.4.2 Kulturbedingungen

Die primären Zellkulturen und Zelllinien wurden routinemäßig in 75 cm² ZKF in einem CO₂-Brutschrank (Heraeus, Hanau) bis zu 80-90 % Konfluenz inkubiert. Hierbei wurde eine Atmosphäre von 37°C, 10 % CO₂-Gehalt und 95 % relative Luftfeuchtigkeit gewählt. Alle 48 h wurde das Zellkulturmedium durch frisches Medium ersetzt.

2.1.5 Passagierung von Zellen

Alle Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt. Bei 80-90 % Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA von den ZKF abgelöst. Hierzu wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin/EDTA (0,5 % in PBS) für 10 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen, bei 1200 upm für 10 min zentrifugiert (Omnifuge 2.0RS, Heraeus Sepatech, Hanau) und in Medium

resuspendiert. Jeweils die Hälfte oder 1/3 der Zellen wurde in einer neuen Kulturflasche ausgesät. Nach wenigen Passagen waren die Makrophagen aus der Kultur durch Passagierung der Zellen entfernt, da sich Makrophagen durch die oben beschriebene Trypsinbehandlung nicht wie Fibroblasten von der Kulturflasche ablösen. Als Reinheitskontrolle der Fibroblastenpopulation erfolgte eine Immunhistochemie (s. III.2.5) unter Verwendung von Fibroblasten-Ak (s. III.1.5), Makrophagen- (CD68), NK-Zellen- (CD11b) und Monozyten-Ak (CD14; s. III.1.5).

2.1.6 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer im Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Lebende Zellen nehmen durch eine intakte Zellmembran kein Trypanblau auf, in tote Zellen tritt der blaue Farbstoff ein. Aus einer gut resuspendierten Zellkultur wurde ein Aliquot entnommen, mit Trypanblau-Lösung 1:1 verdünnt und unter dem Mikroskop in der 100fachen Vergrößerung ausgewertet. Die lebenden Zellen der vier diagonal gegenüberliegenden und 16-fach unterteilten Quadrate wurden ausgezählt und die Gesamtzellzahl pro ml aus der erhaltenen Zellzahl multipliziert mit 2500 unter Berücksichtigung der Verdünnung errechnet.

2.1.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Tabelle 13: Einfriermedium

Einfriermedium	
45 ml	FCS
5 ml	DMSO, 10 % (v/v)

Zur Langzeitlagerung wurde ein Teil der Zellen eingefroren. Die trypsinisierten Zellen aus einer 75 cm² ZKF bei ca. 80-90 % Konfluenz wurden hierzu in 2 ml auf 4°C vorgekühltes Einfriermedium aufgenommen und 1 ml je Einfrierröhrchen aufgeteilt. Die Zellen wurden sofort auf Eis gelagert und möglichst schnell in einen Einfrierbehälter transferiert. Der Behälter wurde über Nacht bei -80°C gelagert, um ein Abkühlen der Zellen mit 1°C pro min zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen in einen Flüssigstickstofftank überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch vorsichtiges Erwärmen des Einfrierröhrchens bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen in vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt, bei 1200 upm zentrifugiert und in ZKF mit Medium überführt. Nach 12 h

wurde das Medium gegen frisches ausgetauscht und die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert (s. III.2.1.4.2).

2.1.8 Stimulierungsversuche

Die Stimulierungsversuche wurden unter Zellkulturbedingungen wie unter III.2.1.4 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden bis zu 80-90 % Konfluenz in 75 cm² ZKF kultiviert und 5×10^5 Zellen pro Loch in 6-Loch Platten ausgesät. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen über Nacht kultiviert und anschließend mit PBS gewaschen. 2 ml DMEM mit den entsprechenden Proteinen (IL-10, IL-1Ra, sTNF RI, Konzentrationen s. IV.1.2) wurden auf die Zellen gegeben und die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert.

2.2 Viraler Gentransfer

Der virale Gentransfer dient dem Einbringen von fremder DNA in Zellen zur Proteinexpression und der Untersuchung von Genfunktion und -regulation.

2.2.1 Adenoviraler Gentransfer

2.2.1.1 Adenovirale Vektoren

Jeder in diesen Versuchen verwendete rekombinante adenovirale Vektor stammt von replikationsdefizienten Typ 5-Adenoviren ab, denen Bestandteile der Replikationsdomänen deletiert wurden. Alle Adenoviren werden mittels eines CMV-Promotors reguliert (CytoMegaloVirus Promotor). Zwei verschiedene Replikationsdefiziente Typ 5-Adenoviren wurden verwendet:

- A) Zum einen ein Ad-5 Adenovirus, dem Teile des Replikationslokus E1 deletiert wurden ($\Delta E1$). Die entsprechende cDNA der inserierten Gene wurde anstelle der E1-Region in den adenoviralen Vektor inseriert: AdLacZ kodiert für das Gen β -Galaktosidase, AdsTNFR1 für den löslichen TNF α -Rezeptor p55 (Lechman et al., 1999).
- B) Zum anderen ein Ad-5 Adenovirus, aus dessen Genom sowohl Teile des Replikationslokus E1 als auch des Lokus E3 deletiert wurden ($\Delta E1/\Delta E3$). Anstelle der deletierten E1-Region wurden folgende Gene inseriert: AdEGFP kodiert für das grün fluoreszierende Protein („enhanced green fluorescent protein“). AdvIL-

10 kodiert für das virale IL-10, AdhIL-10 für das humane IL-10, AdIL-1Ra für den humanen IL-1 Rezeptorantagonisten und AdsTNFRI für den löslichen TNF α -Rezeptor p55 (Lechman et al., 1999).

Die Δ E1 Ad-5 Adenoviren wurden freundlicherweise von J. Mountz, die Δ E1/ Δ E3 Ad-5 Adenoviren von C. Evans und P. Robbins zur Verfügung gestellt.

2.2.1.2 Adenovirale Transduktion

Zur adenoviralen Transduktion von synovialen Fibroblasten *in vitro* wurden die Zellen unter Standardbedingungen bis zu 80-90 % Konfluenz in 75 cm² ZKF kultiviert. Anschließend wurden 5×10^5 Zellen pro Loch in 6-Loch Platten ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht kultiviert und anschließend mit Ca²⁺/Mg²⁺-enthaltendem PBS gewaschen. Die Adenoviren wurden in einem Infektionsvolumen von 500 μ l Ca²⁺/Mg²⁺-enthaltendem PBS pro Loch auf die Zellen gegeben. Die Partikelanzahl entsprach hierbei der 10-30fachen Zellzahl (MOI („multiplicity of infection“) = 10-30). Für Doppelgentransfer wurden jeweils entsprechend gleiche MOI beider Viren in 500 μ l Infektionsvolumen auf die Zellen gegeben. Nach 2 h Inkubation bei 37°C mit dem Viren enthaltenden Überstand wurden die Zellen mehrfach sorgfältig mit PBS gewaschen und 2 ml DMEM auf die Zellen gegeben. 48 h nach Transduktion wurde der Zellkulturüberstand entfernt und 500 μ l für Zytokin-ELISAs bei -20°C eingefroren. 1,5 ml Überstand wurden für Überstandstransfer-Experimente verwendet (s. III.2.2.4). Zur adenoviralen Transduktion von komplettem Synovium *in vitro* wurden 2-3 mm³ große Stücke Synovialgewebe präpariert, in 96-Loch Platten gegeben und mit $5-7 \times 10^5$ Virenpartikeln für 2 h mit 50 μ l Ca²⁺/Mg²⁺-enthaltendem PBS bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mehrfach in PBS gewaschen und 100 μ l DMEM auf die Zellen gegeben. Die Kultivierung bis zur Implantierung erfolgte bei 37°C/10 % CO₂.

2.2.2 Retroviraler Gentransfer

2.2.2.1 Retrovirale Vektoren

Die Herstellung einer ψ -CRIP Linie für MFG-Konstrukte wie MFG-IRAP wurde bereits beschrieben (Danos et al., 1988; Makarov et al., 1996; Baragi, 2000). MFG-IRAP kodiert für IL-1Ra, MFG-hIL-10 für humanes und MFG-vIL-10 für virales IL-10.

2.2.2.2 Retrovirale Transduktion

Die retrovirale Transduktion von synovialen Fibroblasten *in vitro* wurde in 12- oder 6-Loch Platten durchgeführt. Die synovialen Fibroblasten wurden bis zu 80-90 % Konfluenz in 75 cm² ZKF kultiviert und anschließend 5 x 10⁵ Zellen pro Loch (6-Loch Platte) bzw. 1,5 x 10⁵ pro 12-Loch (12-Loch Platte) ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert und anschließend mit PBS gewaschen. Es folgten 8 h Inkubation bei 37°C/10 % CO₂ mit 50-200 MOI des entsprechenden Retrovirus in einem Infektionsvolumen von 300 µl DMEM mit 8 µg/ml Polybrene. Anschließend wurde der Virenüberstand ausgetauscht und die Zellen bei 3000 upm bei 4°C oder Raumtemperatur für 0,5-2 h zentrifugiert. Die Zellen wurden dann für weitere 6-8 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Viren enthaltende Überstand entfernt, die Zellen gründlich gewaschen und mit 2 ml DMEM versetzt. Nach 48 h wurden 500 µl Überstand für Zytokin-ELISAs bei -20°C eingefroren und 1,5 ml Überstand für Überstandstransfer-Experimente verwendet (s. III.2.2.4). Bei zu geringer Transduktionseffizienz nach 48 h wurde die retrovirale Transduktion nach demselben Schema wiederholt.

2.2.3 *b*-Galaktosidase Nachweis

Das für die β -Galaktosidase (β -Gal) kodierende lacZ-Gen von *E. coli* wird als Reporter gen für virale Genexpressionsstudien verwendet. Die enzymatische Aktivität von β -Gal kann durch Zugabe des Substrats X-Gal (3-Indolyl- β -D-galaktopyranosid) in einer Farbreaktion nachgewiesen werden. Hierzu wurde der β -Gal Staining Kit verwendet. Die Zellen wurden mit 2 % Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd in PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixiert, danach 3x mit PBS gewaschen und die Färbelösung (X-Gal Lösung mit Eisenpuffer im Verhältnis 1:20) für 30 min bis zu 2 h auf die Zellen gegeben. Die Färbelösung wurde entfernt, die Zellen 3x gewaschen, und der Prozentsatz der blauen Kernfärbung im Mikroskop durch Auszählung ermittelt.

2.2.4 Überstandstransfer

Die Übertragung von Zellkulturüberstand transduzierter synovialer Fibroblasten auf nicht transduzierte Zellen derselben Herkunft wurde durchgeführt, um viral vermittelte

intrazelluläre Effekte auszuschließen. Die nicht transduzierten Zellen wurden parallel zu den transduzierten Zellen in 6-Loch Platten ausgesät (5×10^5 Zellen). Nach Inkubation über Nacht bei 37°C mit DMEM, wurden die Zellen gewaschen und 1,5 ml Medium durch 1,5 ml des Zellkulturüberstandes der transduzierten Zellen ersetzt, welcher die durch die transduzierten Zellen produzierten Proteine enthielt. Zusätzlich wurden 500 µl frisches DMEM hinzugefügt und parallel unter denselben Bedingungen wie die transduzierten Zellen kultiviert.

2.3 SCID-Maus-Modell der RA

2.3.1 Koimplantierung von Zellen/Geweben und Knorpel in die SCID-Maus

4 Wochen alte SCID-Mäuse wurden von einer keimfreien Zucht (Charles River, Sulzfeld) bezogen und vor, nach sowie während der Operation auf makroskopisch sichtbare Anomalien untersucht. SCID-Mäuse besitzen weder B- noch T-Zellen und sind daher nicht in der Lage, humane implantierte Gewebe abzustößen. Am Tag der Implantierung wurde gesunder humaner Knorpel von Patienten gewonnen, die sich in der orthopädischen Klinik der Universität einer Routineoperation unterzogen.

2.3.1.1 Narkose

Zur Narkose der SCID-Mäuse wurden Ketamin und Xylazin verwendet. Die Applikation erfolgte intraperitoneal. Die Dosierung betrug 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 15 mg/kg Körpergewicht Xylazin. Die Narkosedauer betrug zwischen 20 und 40 min, abhängig von der individuellen Variation der zu narkotisierenden Mäuse.

2.3.1.2 Implantierung unter die Nierenkapsel

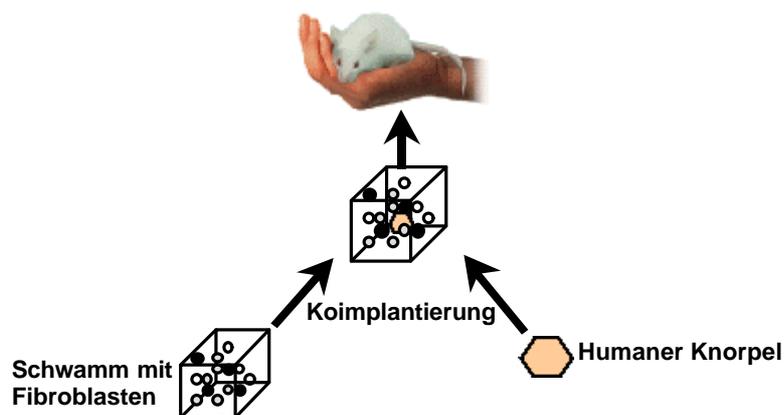
Die Implantierung von kultivierten Fibroblasten und humanem Knorpel erfolgte unter sterilen Bedingungen unter die Nierenkapsel der SCID-Maus (Müller-Ladner et al., 1996). Hierbei wurden die Zellen abtrypsiniert, mehrfach gewaschen und 1×10^5 Zellen in einem Minimalvolumen steriler NaCl-Lösung resuspendiert. Ein etwa 3-5 mm³ großes Stück Schwamm wurde mit der Zellsuspension getränkt und ein würfelförmiges, ca. 2 mm³ großes Stück Knorpel vorbereitet. Die narkotisierte Maus (s. III.2.3.1.1) wurde an der linken Flanke desinfiziert, ein ca. 10 mm großer Einschnitt in die Haut vorgenommen, das Bauchfell über der Niere eröffnet und die

Niere vorsichtig etwas angehoben. Die Nierenkapsel wurde sodann mit einer spitzen Pinzette eröffnet und das Schwammstück zusammen mit dem Knorpel unter der Nierenkapsel platziert. Niere, Bauchfell und Haut wurden in die Ausgangslage gebracht und die Haut mittels eines chirurgischen Fadens vernäht. Ein Tropfen Ciprofloxacin wurde auf die Zunge der Maus getropft und die Maus bis zum Erwachen auf einem Wärmekissen warm gehalten.

2.3.1.3 Implantierung unter die Haut

Die Implantierung von kultivierten Fibroblasten bzw. des kompletten Synoviums und von gesundem, humanen Knorpel wurde unter sterilen Bedingungen mittels der neu entwickelten „inverse wrap“ Methode durchgeführt (Judex et al., 2001). Hierbei wird ein würfelförmiges Stück inerte Schwamm (ca. 80 mm³) aufgeschnitten und 1-2 ca. 3-5 mm³ große Stücke Knorpel in den Schwamm eingebettet. Anschließend wird der Schwamm mit in steriler Kochsalzlösung resuspendierten Fibroblasten (ca. 1-5 x 10⁵ Zellen) getränkt. Alternativ wurde ein ca. 5 mm³ großes Stück Synovium neben den Knorpel platziert und der Schwammkomplex mit steriler NaCl getränkt. Die Haut der betäubten Maus (s. III.2.3.1.1) wurde auf der linken Körperseite chirurgisch eröffnet und die Haut vom Bindegewebe etwas abgehoben, um eine Tasche zu erhalten. In diese Unterhauttasche wurden 1-3 Schwammkomplexe desselben Patienten eingesetzt. Anschließend wurde die Haut mit einem chirurgischen Faden vernäht, 1 Tropfen Ciprofloxacin auf die Zunge der Maus getropft und die Maus bis zum Aufwachen auf einem Wärmekissen warm gehalten.

Abbildung 5: Implantierung in die SCID-Maus mittels der „Inverse wrap“ Methode



2.3.1.4 Bestimmung des Invasions- bzw. Degradationsgrades von implantierten Knorpel

Die Invasion, bzw. perichondrozytische Knorpeldegradation wird nach folgendem

„Score“ bestimmt:	Invasion:	0 = keine oder minimale Invasion
		1 = sichtbare Invasion (2 Zelltiefen)
		2 = Invasion (5 Zelltiefen)
		3 = starke Invasion (> 10 Zelltiefen)
	Degradation:	0 = keine Degradation (scharfer, intakter Chondrozytenhof)
		1= sichtbare Degradation (1 Chondrondurchmesser Knorpel um den Chondrozytenhof ist degradiert)
		2 = Degradation (1-2 Durchmesser degradiert)
		3 = intensive Degradation (> 2 Durchmesser degradiert)

2.3.1.5 Applikation von fluoreszenzgekoppeltem Albumin

Mittels fluoreszenzgekoppelten Albumin konnten implantierte Fibroblasten, bzw. das komplett implantierte Synovium lokalisiert werden, da sehr stoffwechselaktive Zellen, wie z.B. RA-Fibroblasten, Albumin aufnehmen.

Fluoreszenzgekoppeltes Albumin wurde SCID-Mäusen appliziert, denen mittels der „inverse wrap“-Methode synoviale Fibroblasten bzw. komplettes Synovium und gesunder humaner Knorpel implantiert wurde. 60 Tage nach Implantierung wurde den Tieren 6 h vor dem Töten mit CO₂ und der Implantatentnahme (s. III.2.3.1.6) intraperitoneal fluoreszenzgekoppeltes Albumin gespritzt:

AFLc-HSA Einsatz: zwischen 7-14,5 mg/kg Körpergewicht

TCPH-HSA Einsatz: zwischen 3 und 6 mg/kg Körpergewicht

Das fluoreszenzgekoppelte Albumin wurde freundlicherweise von A. Wunder, DKFZ Heidelberg zur Verfügung gestellt.

2.3.1.6 Implantatentnahme und -aufarbeitung

Nach 60 Tagen wurden die Mäuse mittels CO₂ tierschutzgerecht getötet, den Tieren sogleich Blut (Heparinblut) und die Implantate entnommen. Die Implantatentnahme nach der Tötung der Tiere erfolgte möglichst schnell, um Degradations- und Abbauprozesse im Implantat zu vermeiden. Die meisten Implantate wurde umgehend in Gefriermedium (OCT™ Tissue-Tek®) eingebettet und in flüssigem Stickstoff langsam eingefroren. Die Lagerung der Gewebe erfolgte bei -80°C. Ein Teil der

Implantate wurde zunächst in 45 %igem Formalin bei 4°C für einige Stunden eingelegt, anschließend in 50 % Ethanol bei 4°C gelagert, bis sie in Paraffin eingebettet wurden. Das entnommene Blut wurde bei 4°C aufbewahrt, bis es abesert werden konnte. Dazu wurde das Blut bei 4°C mit 2000 upm für 10 min zentrifugiert und das Serum in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (ERG) überführt und bei -20°C eingefroren.

2.4 *In situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung dient der Detektion von spezifischer mRNA in Zellen verschiedenster Gewebe. Hierbei haben nicht radioaktiv markierte Sonden inzwischen eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität erreicht wie die ursprünglich verwendeten radioaktiven Sonden (Giaid et al., 1989; Denijn et al., 1990). Im Gegensatz zur Immunhistochemie müssen aber bei der *in situ* Hybridisierung mehrere Einflußfaktoren beachtet werden: Die absolute Vermeidung einer RNase-Kontamination in allen Arbeitsschritten bis zur Hybridisierungsphase und die kontinuierliche Überwachung der Farbentwicklung am Ende der *in situ* Hybridisierung, um ein möglichst gutes Signal- zu Hintergrundverhältnis zu erhalten.

2.4.1 Puffer und Lösungen

100x Denhardt's Lösung:	20 g/l 20 g/l 20 g/l	Ficoll 400 Polyvinylpyrrolidon BSA
Prähybridisierungspuffer:	50 % (v/v) 40 % (v/v) 1x 0,5 mg/ml 0,25 mg/ml	Formamid Dextransulfat, gelöst in 20x SSC Denhardt's Lösung Heringsspermien-DNA, denaturiert 10 min 65°C Hefe-t-RNA
STE:	500 mM 20 mM 1 mM	NaCl Tris-Cl (pH 7.5) EDTA
20x SSC:	3 M 0,3 M	NaCl Natriumcitrat pH-Wert mit NaOH auf 7,0 eingestellt
Lösung A:	10 % (v/v) 50 % (v/v)	20x SSC Formamid
Lösung B1:	150 ml 1,5 ml	1x SSC 20 % SDS
Lösung B2:	150 ml 1,5 ml	0,5x SSC 20 % SDS

Lösung B3:	150 ml 1,5 ml	0,1x SSC 20 % SDS
Tris/NaCl pH 7,6	0,1 M 0,15 M	Tris NaCl
Tris/NaCl pH 9,5	0,1 M 0,1 M 0,05 M	Tris NaCl MgCl ₂
PVA-Tris	10 % 0,1 M	PVA (Polyvinylalkohol) Tris/NaCl pH 9,5
NBT/BCIP Farblösung:	5 ml 5 mM 0,2 mg/ml 1 mM 0,5 mg/ml	PVA-Tris MgCl ₂ BCIP Levamisol NBT

2.4.2 Herstellung der Sonden für die *in situ* Hybridisierung

Zur Überprüfung der Expression genspezifischer mRNA im Gewebe wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. Hierzu wurden zunächst PCR-Produkte mit denselben Primern hergestellt, die auch bei verschiedenen PCR-Methoden zum Einsatz kamen (s. III.3.3, III.3.4, III.3.5). Die PCR-Produkte wurden mittels TopoCloning in den PCR II-Topo-Vektor kloniert (s. III.3.9.1). Dieser Vektor hat den Vorteil, daß er die Promotoren für die SP6 bzw. T7-RNA-Polymerasen enthält. Dadurch kann die direkte Transkription von RNA-Sonden aus dem Vektor erfolgen. Alle verwendeten Konstrukte wurden mittels Sequenzierung überprüft (s. III.3.9.2, III.3.9.3). Vor Transkription erfolgte zunächst ein Restriktionsverdau des gereinigten Vektors in getrennten Ansätzen mit EcoRV oder BamHI. Durch diese Linearisierung wird die Transkription am Produktende beendet und es entstehen Sonden einheitlicher Länge. Die Transkription erfolgte mit dem MaxiScript™ Kit der Fa. Ambion nach den Angaben des Herstellers. Die Sonden wurden durch Zugabe von Digoxigenin-markiertem UTP (1/3 markiertes, 2/3 unmarkiertes UTP) markiert. Die Aufreinigung erfolgte über ein 2 %iges Agarosegel, Ausschneiden der Sonde aus dem Gel und Eluierung (s. III.3.8.3). Die gereinigten Sonden wurden entweder bei -80°C gelagert oder direkt eingesetzt.

2.4.3 Hybridisierung

Gefrierschnitte mit einer Schnittdicke von 5-8 µm wurden verwendet. Nach kurzer Lufttrocknung wurden die Schnitte 1 h bei Raumtemperatur in 3 % Paraformaldehyd

fixiert. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte in einer RNase-freien, feuchten Kammer mehrfach gewaschen. Der erste Waschschrift erfolgte mit 2x SSC für 5 min, gefolgt von zwei Waschschriften mit Triethanolamin-HCl (0,1 M, pH 8,0). Die Schnitte wurden mit 0,25 % Acetanhydrid in Triethanolamin-HCl angesäuert und nochmals 2x mit Triethanolamin-HCl gewaschen. Die Prähybridisierung erfolgte über 1 h bei Raumtemperatur mit Prähybridisierungspuffer. Die Hybridisierung erfolgte über 12 h in einer feuchten Kammer bei 50-52°C. Als Hybridisierungslösung diente Prähybridisierungspuffer, in dem die RNA-Sonde verdünnt und für 10 min bei 80°C denaturiert worden war. Die Schnitte wurden mit Deckgläschen abgedeckt und mit Nagellack versiegelt. Für jede Sonde wurden mehrere Verdünnungen (5-200 ng/Gewebeschnitt) getestet. Als Kontrolle diente eine Hybridisierung mit der „sense“-Sonde, die lediglich eine minimale Bindung an das Gewebe aufweisen darf.

Nach der Hybridisierung wurde das Deckgläschen entfernt und die Schnitte mehrfach gewaschen: 3x mit 2x SSC, dann 2x mit 2x STE.

Nicht gebundene Sonden wurden mittels eines einstündigen Verdaus mit RNase A bei 37°C (40 µg/ml in STE) entfernt. Anschließend erfolgten folgende Waschschriffe:

3x mit STE

5x mit Lösung A bei 50°C

3x mit 2x SSC

Jeweils 15 min mit den Lösungen B1, B2 und B3 bei 50°C.

2.4.4 Immunhistologischer Nachweis

Der Nachweis der gebundenen Sonden erfolgte immunhistochemisch unter Verwendung von anti-Digoxigenin-Antikörpern (s. III.1.5). Dieser Ak besteht nur aus einem Fab-Fragment gegen Digoxigenin, welches an alkalische Phosphatase gekoppelt ist, wodurch das Risiko einer unspezifischen Bindung des Fc-Teils eines Ak an im Gewebe evtl. stark exprimierte Fc-Rezeptoren vermieden wird.

Weitere unspezifische Ak-Bindungen wurden vermieden, indem die Gewebeschnitte für 30 min bei Raumtemperatur mit 2 %igem Normalserum in Tris-NaCl (0,1 M Tris, 0,2 M NaCl, pH 7,6) geblockt wurden. Die Inkubation mit dem Ak erfolgte ebenfalls in 2 %igem Normalserum in Tris-NaCl für 1 h bei Raumtemperatur. Die Objektträger wurden gründlich mit Tris-NaCl gewaschen und 10 min in 10 mM Tris-HCl pH 9,0/100

mM NaCl alkalisiert. Die Farbentwicklung erfolgte mit NBT/BCIP im Dunkeln für 30 bis 240 min.

Falls die alkalische Phosphatase-Signalentwicklung aufgrund zu geringer Genexpression unbefriedigende Ergebnisse erbrachte, wurde zum Nachweis die Immunogold-Silbertechnik mit photochemischer Entwicklung verwendet (s. III.2.5.1).

2.5 Immunhistochemie

2.5.1 Immunogold-Silbertechnik

Tris/NaCl pH 7,6:	6 g/l	Tris
	8 g/l	NaCl
Citratpuffer	0,3 M	Zitronensäure, Monohydrat
	0,2 M	Zitronensäure, Tri-Natrium Salz
Cacodylatpuffer	0,2 M	Cacodylat pH 7,35
3 % Glutaraldehyd-Cacodylat		
	37,5% (v/v)	Glutaraldehyd (8 %)
	50 % (v/v)	Cacodylatpuffer

Gefrierschnitte mit 5-8 µm Schnittdicke wurden für 5-10 min in Aceton fixiert und anschließend luftgetrocknet. Unspezifische Bindungsstellen der Fc-Rezeptoren wurden in Tris/NaCl pH 7,6 mit 2 % normalem Serum (entsprechend der Herkunft des sekundären Ak) und 4 % Magermilch-Tris Lösung für 40 min bei Raumtemperatur geblockt. Die Schnitte wurden in Tris/NaCl, pH 7,6 gewaschen und für 60 min bei Raumtemperatur mit den entsprechenden primären Ak (in 2% Magermilch-Tris Lösung, s. Tabelle 7) inkubiert. Als Kontroll-Ak dienten jeweils Ak gegen speziesspezifische Immunglobuline. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Tris/NaCl pH 7,6 gewaschen und nachfolgend mit dem sekundären biotinylierten Ak (in Tris/NaCl/2 % Magermilch pH 7,6), welcher gegen den Fc-Teil des primären Ak gerichtet ist (s. Tabelle 8), für 45 min inkubiert. Nach erneutem Waschen in Tris/NaCl pH 7,6 wurden die Schnitte mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin für 45 min in einer Verdünnung von 1:600 in 2% Magermilch/Tris/NaCl, pH 7,6 überschichtet. Hierbei bindet das Streptavidin spezifisch an das Biotin des sekundären Ak. Abschließend wurden die Schnitte für 60 min mit 1:30 in Tris/NaCl, pH 7,6 verdünnten anti-Meerrettichperoxidase-Ak, an die 6 nm große Goldpartikel gebunden waren, inkubiert. Die Signalentwicklung erfolgte photochemisch in der sogenannten Immunogold-Silberreaktion, welche in einer Modifikation des

ursprünglichen Protokolls von Komminoth et al. (1992) durchgeführt wurde. Hierfür wurden die Gewebsschnitte zunächst in Tris/NaCl pH 7,6 gewaschen und danach mit 3 %igem Glutaraldehyd-Cacolydat für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Zur photochemischen Silberverstärkungsreaktion wurde zunächst mit Hydrochinon (2,5 mg/ml in Citratpuffer), anschließend mit der Entwicklungslösung (2,5 mg/ml Hydrochinon in Citratpuffer und 2 mg/ml Silberacetat in H₂O_{dest}) inkubiert. Die Entwicklungszeit betrug zwischen 15-20 min. Die Schnitte wurden nochmals mit photographischem Fixiermedium (10 % Agefix, Agfa, Leverkusen) für 2 min fixiert und anschließend intensiv mit H₂O_{dest} gewaschen. Nun wurden entweder direkt die Deckgläschen zur Beurteilung der Färbung aufgebracht oder eine Doppelmarkierung mittels der AEC-Immunhistochemie (s. III.2.5.2) angeschlossen.

2.5.2 Phosphatase Immunhistochemie (AEC Substrat-Kit)

Tris/NaCl pH 7,6	6 g/l	Tris
	8 g/l	NaCl

Diese Technik wurde mit Hilfe des Peroxidase AEC Substrat-Kit durchgeführt und sowohl zur Direktmarkierung von Antigenen als auch zur Doppelmarkierung nach der *in situ* Hybridisierung verwendet. Unspezifische Bindungsstellen wurden mittels Tris/NaCl pH 7,6 mit 4 % Magermilch/Tris und 2 % normalem Serum, je nach Herkunft der primären Ak, geblockt (s. Tabelle 7). Nach Waschen mit Tris/NaCl pH 7,6 wurde mit dem primären Ak in Tris/NaCl pH 7,6 mit 2 % Magermilchpulver für 1 h inkubiert. Nach gründlichem Waschen in Tris/NaCl pH 7,6 erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Ak in Tris/NaCl pH 7,6 mit 2 % Magermilchpulver (s. Tabelle 8) für 45 min. Nach mehrfachem Waschen mit Tris/NaCl pH 9,7 wurde mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin (Dianova, Hamburg) für 45 min inkubiert. Die Signaldetektion erfolgte unter Verwendung des AEC Substrat-Kits nach Angaben des Herstellers. Das Substrat wurde für 30 min auf die Schnitte aufgebracht, eine Farbreaktion konnte nach 1-30 min detektiert werden. Die Färbung wurde mittels Waschen mit Tris/NaCl pH 7,6 gestoppt.

2.5.3 Immunzytochemie

Für die Immunzytochemie wurden synoviale Fibroblasten in 75 cm² ZKF bis 80 % Konfluenz kultiviert und anschließend 7,5 x 10⁴ Zellen in 4-Kammer Chamber-Slides

ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen 5-10 min mit Aceton fixiert und anschließend mehrfach mit Tris/NaCl pH 7,6 gewaschen. Die folgenden Arbeitsschritte entsprechen der AEC Immunhistochemie (s. III.2.5.2).

2.6 ELISA

Die Konzentrationen verschiedener Proteine im Zellkulturüberstand und im Serum von SCID-Mäusen wurden mittels ELISA (s. Tabelle 9) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Hierzu wurden verschiedene Verdünnungen (1:2, 1:50, 1:100, 1:500) der bei -20°C eingefrorenen Überstände von nicht stimulierten und stimulierten/transduzierten Zellen verwendet. Die Mausseren wurden, sofern nicht vom Hersteller anders angegeben, unverdünnt verwendet.

3. Molekularbiologische Methoden

3.1 RNA Isolierung

Zur RNA-Isolierung aus Zellkulturen wurde der RNeasy[®] Spin Column Purification Kit der Firma Qiagen verwendet. Bei 80-90 % Konfluenz der Zellen wurde das Medium entfernt und mit PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte direkt in der ZKF mit 600 µl Lysepuffer pro 75 cm² ZKF (350 µl pro 6-Loch Platte, bzw. pro 25 cm² ZKF). Das Lysat wurde mittels Qia-Shredder-Säulen (Qiagen) homogenisiert. Im weiteren wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

Um DNA-Verunreinigungen zu minimieren, wurde das Isolierungsprotokoll mit einem 40minütigen DNase-Verdau ergänzt (RNase-free DNase Set, Qiagen). Die RNA wurde bei -80°C aliquotiert gelagert, um wiederholtes Auftauen zu vermeiden.

3.1.1 RNA-Konzentrationsbestimmung

3.1.1.1 Ethidiumbromidplatten

Die RNA-Konzentrationen wurden zunächst mit sogenannten Ethidiumbromid-Platten bestimmt. Die Platten enthalten 1 % (w/v) Agarose in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) mit 1 µg/ml Ethidiumbromid. Je 1 µl der zu bestimmenden RNA-Lösung, gegebenenfalls mit Verdünnungen und RNA-Standards (12,5; 25; 50; 100;

200 ng/ μ l) wurden aufgetragen, wobei durch Vergleich der Fluoreszenzstärke unter UV-Licht (254 nm) die unbekannte Konzentration der Probe abgeschätzt werden konnte.

3.1.1.2 RiboGreen™ RNA Quantitation Kit

Zur exakten Konzentrationsbestimmung der RNA für die RT-PCR und cDNA-Arrays wurde der RiboGreen™ RNA Quantitation Kit verwendet. Hierbei wird der Fluoreszenzfarbstoff RiboGreen verwendet, der sich an die RNA anlagert. Die Fluoreszenz konnte dann in einem Spectra Fluor Plus Fluorometer bestimmt und die RNA-Konzentrationen anschließend mit Hilfe der Magellan Software ermittelt werden.

3.2 Oligonukleotid-Design

Beim Entwurf der genspezifischen Oligonukleotide wurden folgende Parameter beachtet:

Oligonukleotid-Länge: Die Länge betrug zwischen 18-22 Bp, wobei für jeden Primer eines Paares dieselbe Länge gewählt wurde.

GC-Gehalt: Der GC-Gehalt hat Auswirkungen auf die Schmelztemperatur des Oligonukleotids und somit auf die Primerbindungs-Temperatur. Der GC-Gehalt wurde zwischen 45 und 55 % gewählt, hierbei sollte der GC-Gehalt der beiden Oligonukleotide möglichst gleich sein.

Primerbindungs-Temperatur: Für Realtime-PCR und QuantumRNA™-PCR (s. III.3.4, III.3.5) wurden Primerbindungs-Temperaturen gewählt, die zu denen des internen Standards (18S-RNA) passen. Die 18S-RNA-PCR besitzt vertretbare Effizienzen ($E=2\pm 0,05$) für die Realtime-PCR zwischen 55-59°C (s. III.3.5.1).

Amplifikatlänge: Die Produktlänge wurde zwischen 300-800 Bp gewählt, da sie im idealen Bereich für alle verwendeten PCR-Methoden liegt, ohne einen vorzeitigen Elongationsabbruch der PCR-Produkte zu bewirken. Für Realtime-PCR Experimente mit dem LightCycler (s. III.3.5) wurden Produktlängen zwischen 250 und 400 Bp gewählt, wie vom Hersteller empfohlen.

3.3 RT-PCR

3.3.1 Reverse Transkription

Für die RT wurde der 1st Strand cDNA Synthesis-Kit mit AMV reverser Transkriptase verwendet. Der Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese wurde in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen auf Eis hergestellt:

Reagenzien	µl pro 20 µl Ansatz	Endkonzentration
10x RT-Puffer	2	1x
25 mM MgCl ₂	4	5 mM
10 mM dNTP	2	1 mM
Random Hexamers p(dN) ₆	2	3,2 g
AMV Reverse Transkriptase	0,8	8 U
RNase Inhibitor (40 U/µl)	1	40 U
RNA	x	100-500 ng
H ₂ O bidest	ad 20	

Die cDNA-Synthese erfolgte unter folgenden Bedingungen:

25°C	10 min	Binden der Oligonukleotide an die RNA
42°C	60 min	Überschreiben der RNA in cDNA
68°C	15 min	Inaktivierung der Reversen Transkriptase

3.3.2 PCR

Die PCR wurde nach (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988) in 0,2 ml-ERG in 20 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Als Matrize diente cDNA (s. III.3.3.1) oder gereinigte Plasmid-DNA (s. III.3.9.1.2). Des weiteren wurden je 10 pmol der entsprechenden Oligonukleotid-Primer (s. Tabelle 4) und 10 µl des Mastermixes aus dem *Taq* PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hilden) hinzugefügt und mit Nukleinsäure-freiem H₂O_{bidest} auf 20 µl aufgefüllt. Die Amplifizierung erfolgte standardmäßig in einem Thermocycler nach folgendem Programm:

5 min	95°C		Denaturierung
35x	95°C	30 sec	Denaturierung
	T _{ann}	30 sec	Primerbindung
	72°C	60 sec	Primerverlängerung
7 min	72°C		Primerverlängerung

T_{ann} ist vom jeweils eingesetzten Oligonukleotid-Primerpaar abhängig (s. III.3.2).

3.4 QuantumRNA[®]-PCR

Bei der QuantumRNA[™]-PCR wird die Expression eines genspezifischen PCR-Produkts in Relation zu einem Haushaltsgen (sog. „Housekeeping“-Gen) in einer RT-PCR semiquantitativ bestimmt. Das Prinzip der QuantumRNA[™]-PCR basiert auf einer Multiplex-PCR mit genspezifischen Primern, 18S-rRNA-Primern und sogenannten Competimers. Die Competimers sind modifizierte 18S-rRNA-Primer, die nicht von der Taq-Polymerase verlängert werden können und somit mit den 18S-rRNA-Primern konkurrieren. Wählt man das Verhältnis von 18S-Primern und Competimers entsprechend, daß die resultierende Menge an spezifischen PCR-Produkt in derselben Reaktion der Menge amplifizierten 18S-Produkt entspricht, kann man aus dem Verhältnis der Bandenstärke der beiden resultierenden Banden bei mehreren Proben auf einem Gel die relative Expression des jeweiligen Gens bestimmen. Essenziell für die Vergleichbarkeit der Expression ist eine möglichst geringe Anzahl an PCR-Zyklen, um möglichst in der exponentiellen Phase der Produktamplifizierung zu liegen. Das ideale Mischungsverhältnis von 18S-Primern und Competimers wird in Vorversuchen für jedes zu untersuchende Gen ermittelt.

3.4.1 Reverse Transkription

Die RT wurde wie in Kapitel III.3.4.1 mit Hilfe des 1st Strand cDNA Synthesis-Kit hergestellt. Anschließend wurde die Reaktion mit H₂O_{bidest} auf 50 µl aufgefüllt.

3.4.2 PCR

Die PCR wurde mit Hilfe des QuantumRNA[™]-PCR-Kits in 0,2 ml-ERG in einem 20 µl-Volumen hergestellt. Die als Matrize dienende cDNA (s. III.3.3.1), je 10 pmol der entsprechenden genspezifischen Oligonukleotid-Primer (s. Tabelle 4), die entsprechende Menge 18S- und Competimer-Primer, 2 µCi α³²P-dCTP und 10 µl des Mastermixes aus dem QuantumRNA[™]-PCR-Kit wurden hinzugefügt und mit Nukleinsäure-freiem H₂O_{bidest} auf 20 µl aufgefüllt. Die Zyklenzahl variierte zwischen 18 und 30 Zyklen, individuell ausgetestet für die jeweilig untersuchten Gene. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf 4-20 %igen Gradientengelen elektrophoretisch aufgetrennt (s. III.3.8.4.2).

Die Amplifizierung erfolgte nach folgendem Programm:

5 min	95°C		Denaturierung
X _{Zyklen}	94°C	30 sec	Denaturierung
	T _{ann}	30 sec	Primerbindung
	72°C	30 sec	Primerverlängerung
7 min	72°C		Primerverlängerung

T_{ann} hängt von den eingesetzten Oligonukleotid-Primern ab (s. III.1.3, III.3.2).

3.4.3 Phosphorimaging

Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimagers. Hierzu wird das getrocknete Gel auf einem Phosphorimager-Screen aufgelegt. Die ionisierende β -Strahlung, die das in die PCR-Produkte inkorporierte $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP emittiert, erzeugt ein latentes Bild auf dem Phosphorimager-Screen. Beim Einscannen des Screens mittels eines Phosphorimagers (STORM 860, Molecular Dynamics, Freiburg) werden die bereits angeregten BaFBR:EU⁺²-Kristalle in dem Phosphorimager-Screen mit einem Laser weiter angeregt, woraufhin sie Energie als blaues Licht freisetzen und in den Grundzustand zurückfallen. Das emittierte blaue Licht wird detektiert und in ein quantitatives Bild des Gels umgesetzt. Das so generierte Bild kann dann mittels der ImageQuant Software ausgewertet werden. Hierzu werden die einzelnen Banden mit Hilfe der Software gleichmäßig und möglichst eng eingegrenzt. Das Programm errechnet dann die „Schwärzung“ der Banden in „counts“. Diese arbiträre Einheit stellt die Intensität der Photonenemission aus dem Phosphorimager-Screen und somit ein indirektes Maß für die Menge an erzeugtem PCR-Produkt dar.

3.5 Realtime-PCR mit einem LightCycler

Zur relativen Quantifizierung von mRNA stand ein Realtime-PCR Gerät, ein LightCycler, zur Verfügung. Die relative Quantifizierung wurde mit Hilfe des LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I-Kits durchgeführt. Die Methode beruht auf einem in Lösung schwach fluoreszierenden Farbstoff, SYBRGreen, dessen Fluoreszenz jedoch durch Bindung an doppelsträngige DNA stark zunimmt. Während der Elongationsphase können immer mehr Farbstoffmoleküle an die neusynthetisierte DNA binden. Der LightCycler mißt am Ende eines jeden

Elongationsschrittes die Gesamtfluoreszenz in der Kapillare (530 nm, Kanal 1) und somit die Zunahme an PCR-Produkt.

Da die Fluoreszenz unabhängig von der Sequenz der DNA ist, muß nach jedem Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, um das Vorhandensein von Primerdimeren und unspezifischen Produkten ausschließen zu können. Da der Schmelzpunkt, bei der die beiden DNA-Einzelstränge sich voneinander trennen, für jedes PCR-Produkt spezifisch ist und von dessen Länge und GC-Gehalt abhängt, nimmt die Fluoreszenz an diesem Zeitpunkt stark ab, da SYBR-Green nur an doppelsträngige DNA bindet. Zeigt eine Schmelzkurve zwei oder mehrere solche Punkte, ist vom Vorhandensein unspezifischer Produkte auszugehen, wodurch die Quantifizierung unmöglich wird.

Zur relativen Quantifizierung wurde auf die 18S-rRNA als internen Standard zurückgegriffen, wobei die Reaktionen für das zu untersuchende Gen und die 18S-rRNA in parallelen Ansätzen eines Laufes durchgeführt wurden.

3.5.1 PCR-Optimierung für den LightCycler

Zur relativen Quantifizierung müssen die Bedingungen für die verwendeten Oligonukleotid-Paare an die des 18S-rRNA internen Standards angepaßt werden. Die ideale Primerbindungs-Temperatur sollte möglichst nahe an der des internen Standard-Primerpaares liegen (s. III.3.2), da dies ideale PCR-Bedingungen zur Bildung beider Fragmente gewährleistet. Unter idealen PCR-Bedingungen findet eine Produktverdopplung pro Zyklus statt, einer Effizienz von 2 entsprechend. Die PCR-Effizienz E sollte also möglichst nahe an $E=2$ liegen. Zusätzlich sollten die Effizienzen der in Relation gesetzten Gene möglichst nahe beieinander liegen, da ansonsten die Fehler, die durch eine ungleiche Amplifikationseffizienz entstehen, in der relativen Quantifizierung falsche relative Expressionsunterschiede bewirken können. Dies kann durch eine geeignete Oligonukleotid-Wahl vermieden werden (s. III.3.2).

Beispiel für Effizienzen- und Zyklenzahl-abhängige Expressionsunterschiede:

$$n=30$$

$$E=1,95 \quad \rightarrow \quad N=N_0 \times 1,95^{30} = N_0 \times 5,0 \times 10^8$$

\Rightarrow 2,2-facher Unterschied

$$E=1,90 \quad \rightarrow \quad N=N_0 \times 1,90^{30} = N_0 \times 2,3 \times 10^8$$

$$n=30$$

(n: Anzahl Zyklen; N: Anzahl amplifizierter Moleküle; N_0 : Anzahl Ausgangsmoleküle)

Weiterhin muß für die Lightcycler-Analyse eine $MgCl_2$ -Testung vorgenommen werden, um die ideale $MgCl_2$ -Konzentration für die jeweiligen Primerpaare zu ermitteln.

Aus diesen Gründen muß vor jeder relativen Quantifizierung eine Optimierung der PCR stattfinden. Dies erfolgt durch Verwendung von Verdünnungen (entweder 1:10, 1:100 und 1:1000 oder 1:2, 1:4 und 1:8) derselben Matrize mit verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen mittels der Standardmethode nach Roche, Mannheim. Hierbei werden die Verdünnungen als Standard definiert. Mittels der Steigung (slope) der Standardkurve (lg der Konzentration vs. ct-Wert), welche von der Software errechnet wird, kann nun die Effizienz berechnet werden: $E=10^{-1/slope}$. Die Effizienz sollte bei $2 \pm 0,05$ liegen, wobei die Effizienzen zu vergleichender Produkte, spezifisches Gen zu internem Standard, möglichst nahe beieinander liegen sollten.

3.5.2 Reverse Transkription

Die RT wurde wie in Kapitel III.3.3.1 mit Hilfe des 1st Strand cDNA Synthesis-Kit hergestellt.

3.5.3 PCR

Die PCR wurde mit Hilfe des LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I-Kits in LightCycler-Kapillaren in einem 20 μ l-Volumen hergestellt. Die als Matrize dienende cDNA (s. III.3.5.2), je 2 pmol/ μ l der entsprechenden Oligonukleotid-Primer (s. Tabelle 4), 2 μ l des Mastermixes aus dem LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit (enthält 10 mM $MgCl_2$) und entsprechende Konzentrationen an $MgCl_2$ (Primerpaar-spezifisch 2-5 mM, s. III.3.5.1) wurden hinzugefügt. Die Reaktion wurde mit Nukleinsäure-freiem H_2O_{bidest} auf 20 μ l aufgefüllt, mit Hilfe der Zentrifugenadaptoren in die Spitze der Kapillare zentrifugiert und in das LC-Karussell gesteckt.

Die Amplifizierung erfolgte nach folgendem Programm:

10 min	95°C		Aktivierung des Hotstartenzym
45x	95°C	5 sec	Denaturierung
	T_{ann}	5 sec	Primerbindung
	72°C	X_E sec	Primerverlängerung
Aufheizen von 50°C auf 95°C			Schmelzkurve (0,1°C pro sec)

T_{ann} ist vom jeweils eingesetzten Oligonukleotid-Primerpaar abhängig (s. III.3.5.1). Die Dauer der Primerverlängerung (X_E) bei 72°C ist von der Amplifikatlänge abhängig. Hierbei gilt: Produktlänge in Bp/25 = X_E in sek. Die Auswertung der Läufe erfolgte mit Hilfe der LightCycler-Software und MS Excel (s. III.3.5.4).

3.5.4 Auswertung

Mittels der LightCycler-Software konnte der ct-Wert jeder Reaktion bestimmt werden. Hierzu wurde die „Second Derivative Maximum“ Methode verwendet. Der ct-Wert gibt den Zyklus an, bei dem alle analysierten Proben die gleiche Produktmenge aufweisen.

Die ct-Werte der genspezifischen Reaktion wurden auf den ct-Wert der jeweils parallel durchgeführten Reaktion mit 18S-rRNA-Primern normalisiert. Hierzu werden die ct-Werte voneinander subtrahiert: $2^{-[\text{ct}(\text{Gen})-\text{ct}(18\text{S})]}$.

Die Berechnung und graphische Darstellung wurde mit MS Excel durchgeführt.

3.6 RNA arbitrarily primed PCR

Eine Variation des differential displays ist die RAP-PCR, wobei das RNA-Expressionsmuster mehrerer RNA-Populationen verglichen werden kann (McClelland et al., 1994). Das Prinzip dieses RNA-Fingerprints beruht auf arbiträrer Primerbindung sowohl in der Erststrang- als auch in der Zweitstrangsynthese. Die Amplifikate wurden auf denaturierende Polyacrylamid-Gele aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (s. III.3.8.4).

3.6.1 Reverse Transkription für RAP-PCR

Die RT der gesamt-RNA erfolgte nach einem Protokoll von Welsh und McClelland, wobei ein 10 Basen langer, arbiträrer Oligonukleotid-Primer eingesetzt wurde (s. III.1.3). In einem 0,2 ml-Reaktionsgefäß wurden 1 µl 10x RT-Puffer (500 mM Tris pH 8,3, 500 mM KCl, 40 mM MgCl_2), 10 mM DTT, 2 µM 1. arbiträrer Primer, 0,2 mM dNTP, 20 U mMLV-RT, 20 U RNase Inhibitor und 150 ng RNA eingesetzt. Das Reaktionsvolumen wurde auf 10 µl mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ eingestellt. Die RT erfolgte unter folgenden Bedingungen: langsames Aufheizen über 5 min von 25°C auf 37°C zur Anlagerung des Primers an die RNA, gefolgt von 60 min Inkubation bei 37°C,

anschließend erfolgte die Deaktivierung der mMLV-RT für 15 min bei 68°C. Als Kontrolle wurde die RT ohne Zugabe der reversen Transkriptase durchgeführt, um eine eventuelle DNA-Kontamination im nachfolgenden PCR-Schritt auszuschließen.

3.6.2 AP-PCR

Der PCR-Schritt erfolgte in einem 20 µl-Volumen nach einem Protokoll von Welsh und McClelland. Folgender PCR-Ansatz wurde hergestellt: 1 µl 10x Taq-Stoffel-Puffer, 4 mM MgCl₂, 4 µM 2. Arbiträrer Primer, 0,25 mM dNTP, 4 U Stoffelfragment der Taq-Polymerase (PE), 26 µCi α³²P- dCTP (3000 Ci/mM) und 10 µl der RT (s. III.3.6.1). Das Reaktionsvolumen wurde auf 20 µl mit H₂O_{bidest} eingestellt.

Die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

5 min	95°C		Denaturierung
35x	94°C	30 sek	Denaturierung
	35°C	30 sek	Primerbindung
	72°C	60 sek	Primerverlängerung
7 min	72°C.		Primerverlängerung

Als Oligonukleotid-Kombinationen wurden OPN23 (RT) und OPN21 (PCR), bzw. OPN21 (RT) und US6 (PCR) verwendet.

3.7 cDNA-Array

cDNA-Arrays ermöglichen die Analyse der Genexpressionsmuster von hunderten cDNAs in einem Versuch. Die Firma Clontech bietet mehrere AtlasTM cDNA Expressionsarrays mit verschiedenen Kategorien von Genen auf Nylonmembranen an. Die Länge der gebundenen Fragmente liegt zwischen 200–500 Bp und schließt Poly-A Regionen, repetitive Elemente und hoch homologe Segmente aus. Zur Bestimmung der Genexpression in synovialen Fibroblasten wurden cDNA-Arrays mit humanen cDNAs von 200 Zytokinen und 190 Onkogenen/Tumor-Suppressor-Genen verwendet. Jedes Gen ist auf der Membran doppelt vorhanden. Nur Signale, die in beiden Feldern (Spots) erschienen sind, wurden ausgewertet.

3.7.1 Puffer und Lösungen

Denaturierungslösung: 1 M NaOH, 10 mM EDTA

Neutralisierungslösung: 1 M NaH_2PO_4 , pH 7,0

20x SSC-Puffer: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0

Waschlösung I: 2x SSC, 1 % SDS

Waschlösung II: 0,1x SSC, 0,5 % SDS

3.7.2 Herstellung der Hybridisierungsprobe

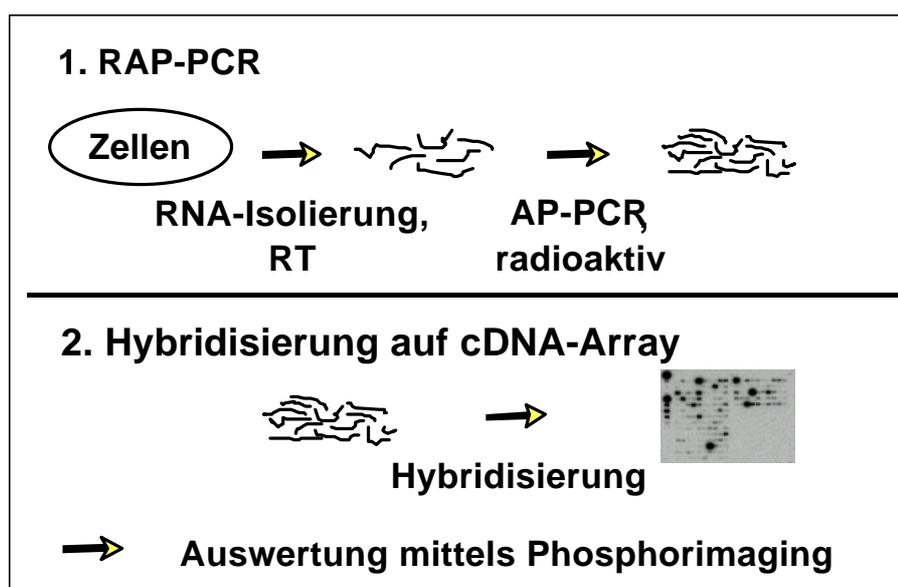
3.7.2.1 Mittels radioaktiver reverser Transkriptase

Die RT wurde mit Hilfe des Atlas™ cDNA Expressions-Kits von Clontech nach Angaben des Herstellers in einem 10 ml-Volumen hergestellt. 1,5-2 μg gesamt-RNA wurde zur Herstellung der radioaktiv markierten cDNA Probe verwendet.

3.7.2.2 Mittels RAP-PCR

Zur Herstellung der Hybridisierungsprobe wurde gesamt-RNA von synovialen Fibroblasten mittels RAP-PCR generiert (s. III.3.6).

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Kombination von RAP-PCR und cDNA-Array



3.7.3 Säulenaufreinigung

Die Reaktionen wurden von nicht eingebauten Nukleotiden und kleinen DNA-Fragmenten (< 0,1 kb) gereinigt. Hierzu wurde der NucleoSpin[®]-Kit, der dem Atlas[™] cDNA Expressions Array-Kit beiliegt, nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Hybridisierungsprobe lag am Ende der Aufreinigung in 100 µl Elutionspuffer vor.

3.7.4 Hybridisierung

Zunächst wurden die Membranen mit Hybridisierungslösung (ExpressHyb, Clontech), versetzt mit 0,1 mg/ml denaturierter Salmon-Testes-DNA (10 min 95°C), in einer kleinen Hybridisierungsflasche zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen prähybridisiert. Hierzu wurden 6 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung zu den Membranen gegeben und für mindestens 30 min bei 68°C im Hybridisierungssofen inkubiert.

Parallel zu der Prähybridisierung der Membranen wurde die Hybridisierungsprobe denaturiert. Die aufgereinigte Sonde wurde mit 1/10 Volumen Denaturierungslösung (s. III.3.7.1) versetzt und 20 min bei 68°C inkubiert. Die nachfolgende Neutralisierung erfolgte durch Zugabe von 5 µl C₀t-1 DNA und 1 Volumen Neutralisierungslösung (s. III.3.7.1) für 10 min bei 68°C. Sobald die Denaturierung der Proben beendet war, wurde die gereinigte, denaturierte Hybridisierungsprobe zu den prähybridisierten Membranen und der Prähybridisierungslösung gegeben und über Nacht bei 68°C hybridisiert.

3.7.5 Waschen

Nach der Hybridisierung erfolgten mehrere Waschschrte, um ungebundene Sonden zu entfernen. Es wurde 3x für jeweils 15 min bei 68°C mit Waschlösung I (s. III.3.7.1) gewaschen, anschließend 1-2x mit Waschlösung II (s. III.3.7.1), je nach Reststrahlung der Membranen nach den Waschschrten mit Lösung I. Die SDS-Rückstände der Waschpuffer wurden durch Schwenken und kurzes Inkubieren bei Raumtemperatur in 2x SSC-Puffer entfernt. Abschließend wurden die Membranen in Plastikfolie unter Luftausschluß eingeschweißt, um ein Austrocknen zu verhindern.

3.7.6 Phosphorimaging

Die Membranen wurden 3-5 Tage auf einem Phosphorimager-Screen aufgelegt, um die Hybridisierungssignale sichtbar zu machen. Die Auswertung erfolgte mittels eines Phosphorimagers (s. III.3.4.3). Das erzeugte Bild konnte mittels ImageQuant Software (Molecular Dynamics, Freiburg) bearbeitet werden. Die Auswertung erfolgte dann mittels Atlas™ 2.0 Software (Clontech, s. III.3.7.7).

3.7.7 Auswertung mittels der Atlas™ 2.0 Software

Die Atlas™ 2.0 Software wurde speziell für die Auswertung von Atlas™ cDNA Expressions Arrays von Clontech entwickelt. Prinzipiell wird hierbei über die Phosphorimager-Datei zunächst ein Array-spezifisches Gitter gelegt und die Hybridisierungssignale an das Arraygitter angepaßt. Anschließend wird automatisch für jedes Hybridisierungssignal eine Intensität berechnet, die auf Haushaltsgene oder global normalisiert wird. Die einzelnen Arrays können dann miteinander verglichen werden und die differentiellen Intensitäten, die den differentiell exprimierten Genen entsprechen, von der Software dargestellt werden.

Alle zu vergleichenden Arrays wurden hierbei auf einen Array mit guter Hybridisierungseffizienz als Kontrolle normalisiert und als Basis für Vergleiche herangezogen. Bei Transduktionsexperimenten wurde gegen die nicht transduzierte Kontrolle normalisiert. Gene, die bereits bei Kontroll-transduzierten Arrays differentiell exprimiert wurden, kamen nicht in die Auswertung.

Array-„Alignment“: Zunächst wurde der entsprechende Array ausgewählt. Über zwei manuell definierte Orientierungspunkte wurde dann die Lage der Membran im Bild definiert, wodurch die Software ein Gitter mit eng eingegrenzten Feldern pro gebundene cDNA-Region („Spot“) über die Membran entsprechend der Lage der gebundenen cDNA legen konnte. Das Gitter besteht pro cDNA aus zwei Feldern (doppelt gespottet), welche die Region der gebundenen cDNA an die Membran genau umgrenzen. Als Ansichtsoption wurde die logarithmische Skalierung gewählt, wodurch auch die Detektion von schwachen Signalen auf den Arrays ermöglicht wird. Anschließend erfolgte eine automatische Anpassung („auto-alignment“) der Spots mit den Hybridisierungssignalen. Die endgültige Feineinstellung der Spots erfolgte dann manuell. Gene, die von benachbarten, stark exprimierten Genen überlagert wurden, konnten manuell aus der Auswertung ausgeschlossen werden, ebenso wie Gene,

deren zwei Hybridisierungsintensitäten stark unterschiedlich waren. Sobald das Gitter exakt auf den Hybridisierungssignalen lag, wurden die Arrays abgespeichert und konnten nun mit anderen Arrays verglichen werden. Die Intensität der einzelnen Gene eines Arrays wird aus dem Mittelwert des rechten und linken Spots errechnet.

Arrayvergleich und Report: Zunächst werden die zwei zu vergleichenden Arrays geöffnet und in der Vergleichsansicht der Software („comparison view“) dargestellt. Hierbei können die einzelnen Arrays sowie die Vergleichsansicht ausgewählt werden. Die Arrays wurden dann mit Hilfe der sogenannten globalen Normalisierung auf ein gleiches Intensitätsniveau gebracht. Hierbei wird der Signalwert jedes einzelnen Genes auf dem Array zur Normalisierung herangezogen. Dadurch entfällt der Abgleich auf Haushaltsgene, die sich oft als nicht konstant exprimiert herausgestellt haben (Bhatia et al., 1994; Savonet et al., 1997). Die abgeglichenen Werte errechnen sich aus den Intensitäten, abzüglich der Hintergrundwerte jedes Arrays, multipliziert mit dem Normalisierungskoeffizienten, der durch die Summenmethode (Default) der Software ermittelt wird. Hierbei werden zwei Werte angegeben:

$$\begin{aligned} \text{Ratio} &= I_{A2} / I_{A1} & A2 &= \text{Array 2} \\ \text{Difference} &= I_{A2} - I_{A1} & A1 &= \text{Array 1} \end{aligned}$$

Die Vergleichsansicht der Arrays stellt pro Gen zwei Felder dar, das obere mit der „Ratio“, das darunter mit der „Difference“. Grün bedeutet gleich exprimiert, blau bedeutet A2 verringert exprimiert im Vergleich zu A1, rot bedeutet erhöht exprimiert, schwarz bedeutet nicht exprimiert.

3.7.8 Strippen der Membranen

Zur mehrfachen Verwendung der Membranen mußte die gebundene Sonde nach Auswertung einer Hybridisierung entfernt werden. Hierfür wurden die Membranen 10 min bei 95°C in 0,5 % SDS unter permanentem Schütteln inkubiert. Nach 10 min Abkühlung wurden die Membranen in 2x SSC geschwenkt und in Plastikfolie eingeschweißt, um ein Austrocknen der Membran zu verhindern. Die Lagerung der gestrippten Membranen erfolgte bei –20°C.

3.8 Gelelektrophorese

3.8.1 Puffer und Lösungen

TAE-Puffer (1x):	40 mM 20 mM 1 mM	Tris Essigsäure EDTA
TBE-Puffer (1x):	10,8 g/l 5,5 g/l 0,372 g/l	Tris Borsäure EDTA
Auftragspuffer für Agarosegele:	50 % (v/v) 0,05 % 0,05 % 10 mM 1 mM	Glyzerin Bromphenolblau Xylencyanol Tris/HCl pH 8 EDTA
Stammlösung für Polyacrylamidgele:	226,8 g 54 ml 90 ml 216 ml	Harnstoff TBE (10x) Acrylamid-bis-Fertiglösung (19:1) H ₂ O
Gebrauchslösung für Polyacrylamidgele:	75 ml 600 µl 75 µl	PAGE Stammlösung APS (10 %) TEMED
Auftragspuffer für Polyacrylamidgele:	2 ml 100 ml 100 mg 100 mg	EDTA 0,5 M pH 8,0 Formamid Xylenxanol Bromphenolblau

3.8.2 Agarosegele

DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in horizontalen Agarosegelen mit 1 µg/ml Ethidiumbromid und 0,8 bis 2 % Agarose in TAE-Puffer (s. III.3.8.1). Die DNA enthaltenden Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit Auftragspuffer (s. III.3.8.1) versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Der Lauf erfolgte in TAE-Puffer bei konstanter Spannung von 100 V. Die DNA-Banden in den Gelen wurden mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht. Die Längenstandards sind unter III.1.6 aufgeführt.

3.8.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Um bestimmte DNA-Fragmente aus Restriktionsansätzen oder PCR-Produkten zu isolieren, wurden diese in Agarosegelen (s. III.3.8.2) aufgetrennt. Das zu isolierende Fragment wurde unter UV-Licht anhand des parallel aufgetrennten Längenmarkers identifiziert, mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein ERG überführt. Die enthaltene DNA wurde unter Verwendung des QIAquick™ Gel Extraction-Kits nach Angaben des Herstellers eluiert.

3.8.4 Polyacrylamidgele

3.8.4.1 Für RAP-PCR-Produkte

Radioaktiv markierte RAP-PCR-Produkte wurden in 5 %igen denaturierenden Polyacrylamid-TBE-Gelen in einer vertikalen Sequenzgelapparatur (Modell S2, Gibco, Karlsruhe) aufgetrennt. Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen. Eine der Glasplatten wurde mit Acrylase vorbehandelt, um das spätere Ablösen der Gele zu erleichtern. Nach Polymerisation wurde das Gel auf 45°C aufgewärmt (100 W, 30-40 min). Die 1:1 mit Auftragspuffer (s. III.3.8.1) versetzten Proben wurden bei 95°C für 5 min denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Leistung von 100 W bei 45°C für ca. 90 min.

Für Autoradiogramme wurden die Gele unter Kunststoffolie auf Whatman 3MM-Chromatographiepapier getrocknet. Dazu wurde ein beheizter Vakuum-Geltrockner (80°C, 60-120 min, Gel Dryer Model 583, Biorad, München) verwendet.

3.8.4.2 Für *QuantumRNA*[®]-PCR (Novex[®]-Minigele)

TBE-Puffer:	10,8 g	Tris
	5,5 g	Borsäure
	0,372 g	EDTA

Die PCR-Produkte wurden auf 4-20 %igen Gradientenfertiggelen der Fa. Novex gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die radioaktiv markierten PCR-Produkte wurden 1:1 mit PAA-Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte für 1 h bei 200 V. Anschließend wurde das Gel auf einem Vakuum-Geltrockner (80°C, 60-120 min, Gel Dryer Model 583, Biorad, München) getrocknet.

3.9 Klonierung, Sequenzierung und Sequenzauswertung

3.9.1 Klonierung

3.9.1.1 Ligation und Transformation

LB ₀ -Medium	15,5 g/l	Luria Broth
LB ₀ -Agarplatten	15,5 g/l 15 g/l 80 µg/ml 100 µg/ml	Luria Broth Agar X-Gal (in DMF gelöst) Ampicillin

Das cDNA-Fragment eines Gens wurde mittels des TOPO™ TA Cloning®-Kit, einem modifizierten T/A-Klonierungssystem, in den Vector PCR II Topo (s. III.1.4) kloniert. Die Taq-Polymerase besitzt eine matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität, wodurch ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3'-Ende eines PCR-Produktes angefügt wird. Ein 3' Desoxythymidin-Überhang an jedem Ende des PCR II-Topo-Vektors, der mit Topoisomerase aktiviert ist, ermöglicht die kovalente Verknüpfung von PCR-Fragment und Vektor durch 5 min Inkubation in einer Salzlösung mit einer Endkonzentration von 200 mM NaCl und 10 mM MgCl₂ bei Raumtemperatur.

Das hergestellte Konstrukt wird dann mittels 30 sek Hitzeschock bei 42°C in kompetente *E. coli* (s. III.1.2) eingebracht. Der Vektor besitzt eine Ampicillinresistenz, daher können erfolgreich transformierte Bakterien auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin selektioniert werden.

Zusätzlich werden Plasmid mit Insert enthaltende Bakterien mittels „blue/white screening“ des PCR II-Topo-Vektors selektioniert. Das in den Vektor inserierte DNA-Fragment unterbricht den Leserahmen des auf dem Plasmid vorhandenen Gens für das Enzym β-Galaktosidase. Bakterien, die ein Insert enthalten, können daher ein Substrat dieses Enzyms (X-Gal) nicht verstoffwechseln und bleiben auf X-Gal enthaltenden Agarplatten weiß. Bakterien, mit leerem Vektor bilden ein blaues Produkt. Von den weißen Kolonien wurden dann Flüssigkulturen angelegt (5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin).

3.9.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um Plasmid-DNA zu gewinnen, wurden Fertigsäulen und -lösungen (QIAprep[®] Spin Miniprep Kit für maximal 5 ml Kulturvolumen bzw. QIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit für maximal 50 ml Kulturvolumen) nach Herstellerangaben verwendet.

Die isolierten Plasmide wurden mittels PCR auf das Vorhandensein eines Inserts der richtigen Größe überprüft. Als Primer wurden hier M13-Sequenzierungsprimer verwendet, da der Vektor entsprechende Primerbindungsstellen aufweist. Der PCR-Ansatz wurde wie unter III.3.3.2 beschrieben durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl und die Einsatzmenge M13-Primer 10 pmol pro Reaktion und 1 µl des isolierten Plasmids. Die PCR erfolgte mit einer Primerbindungs-Temperatur von 55°C.

3.9.1.3 Glycerinkulturen

Transformierte *E. coli*-Stämme wurden als Glycerinkulturen gelagert. Dazu wurde eine 10 ml ÜK abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl LB-Glycerinmedium (LB:Glycerin 1:1) resuspendiert und in einem Kryoröhrchen bei -80°C aufbewahrt.

3.9.2 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxynukleotid-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Der Sequenzieransatz enthielt 100-200 ng gereinigtes PCR-Produkt bzw. 500-600 ng gereinigte Plasmid-DNA und 6 pmol des gewünschten Oligonukleotid-Primers (s. III.1.3). Die Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeit von Herrn Melzl und Herrn Köster am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Prof. Wolf, Regensburg, ausgeführt. Alternativ wurden Sequenzierungen von der Fa. MWG Biotech, Ebersberg, durchgeführt.

3.9.3 Sequenzauswertung

Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels BLAST-Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al., 1997) mit den in der „Nucleotide Sequence Databank“ des „National Institute of Health“ (NIH, Bethesda,

Maryland, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>) gespeicherten Sequenzen verglichen.

3.10 Statistische Analysen

Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung des Lavene-Tests zur Überprüfung der Normalverteilung der Wertegruppen gefolgt von Standard *t*-Test mit statistischer Signifikanzgrenze von $p < 0,05$. Hierzu wurde die Software SPSS von Microsoft verwendet.

Für multifaktorielle Vergleiche von cDNA-Arrays wurde die Signifikanzgrenze mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur angepaßt. Hierbei gilt, bei 100 Vergleichen ergibt sich eine zufällige Signifikanz über $p < 0,05$ in 5 von 100 Vergleichen (α -Fehler Inflation). Daher wird die Signifikanzgrenze entsprechend korrigiert: $p = 0,05/n_{\text{Vergleiche}}$. Beispielsweise bei 100 Vergleichen ergibt sich somit eine neue Signifikanzgrenze von $p < 0,0005$.

3.11 Experimentelles Design der Gentransfer-Experimente

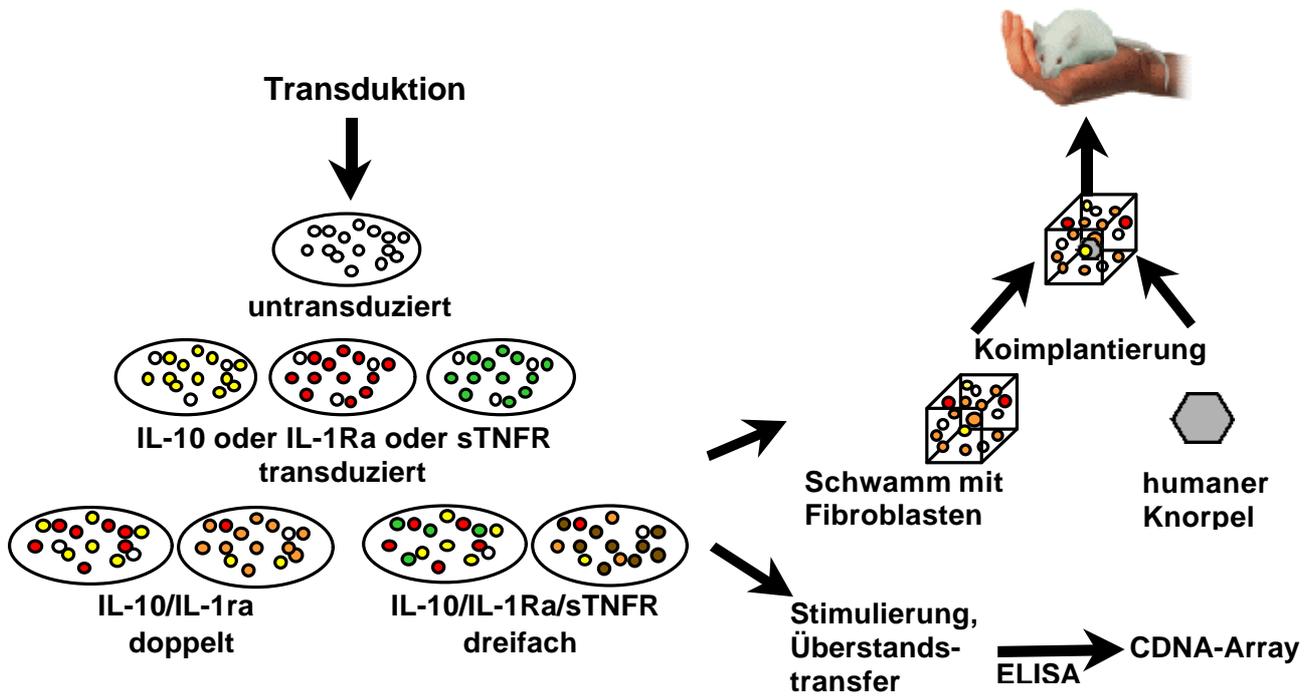
Neben Gentransfer von IL-10, IL-1Ra und sTNF RI in verschiedenen Kombinationen, wurden Stimulierungen und Überstandstransfers für zwei der vier untersuchten synovialen RA-Fibroblastenpopulationen durchgeführt.

Die transduzierten Fibroblasten wurden zusammen mit humanem Knorpel unter die Haut einer SCID-Maus implantiert (jeweils zwei identische Implantate pro SCID-Maus, s. 2.3.1.3). Als Kontrolle wurden Fibroblasten zusammen mit humanen Knorpel unter die Nierenkapsel der SCID-Maus implantiert (s. 2.3.1.2).

Parallel dazu wurden cDNA-Arrays mit der isolierten RNA von Transduktionen, Stimulierungen und Überstandstransfers durchgeführt. Nur Gene, die in allen Versuchen differentiell exprimiert waren, wurden ausgewertet.

Das experimentelle Design für die Gentransfer-Experimente ist in Abbildung 7 dargestellt.

Abbildung 7: Experimentelles Design der Transduktionsversuche. Parallel zu den SCID-Maus-Experimenten wurden Stimulierungen und Überstandstransfers durchgeführt. Von allen Zellen wurden parallel zu den SCID-Maus-Experimenten cDNA-Arrays durchgeführt.



IV. ERGEBNISSE

1. Etablierung der Methoden

1.1 Kombination RAP-PCR und cDNA-Array

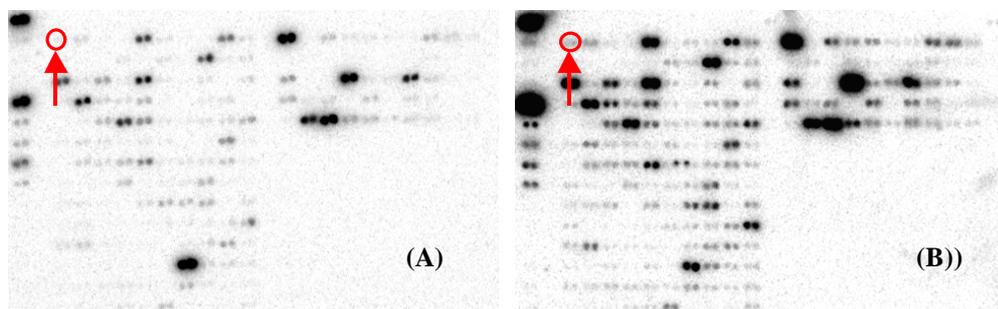
Zur Etablierung der cDNA-Array Experimente wurden synoviale Fibroblasten verwendet. Eine Kultivierung war jedoch nur über eine begrenzte Anzahl von Passagen möglich. Nach 9-10 Passagen ließ sich ein verringertes Wachstumsverhalten, verbunden mit einem zunehmenden Verlust der spindelförmigen, fibroblastenartigen Form, feststellen. Aus diesem Grund war auch die Menge an mRNA, die zur Verfügung stand, limitiert, vor allem da mehrere Experimente mit den Zellen parallel durchgeführt werden mußten (s. III.3.11). cDNA-Array in Kombination mit RAP-PCR bot daher eine Möglichkeit, geringe Mengen an mRNA zu amplifizieren und die dann radioaktiv markierten Proben auf die cDNA-Array Membranen zu hybridisieren.

Mittels der arbiträr gepimten RAP-PCR kann je nach Primerkombination in der Regel nur ein Teil der den auf den Arrays gebundenen cDNAs entsprechenden Sequenzen amplifiziert werden. Daher wurden zunächst 10 verschiedene Primer mittels RAP-PCR und Fingerprint-Gelelektrophorese getestet, um eine Primerkombination zu finden, die möglichst viele Fragmente, die auf den Arrays gebunden sind, amplifiziert. Als effektivste Primerkombination erwies sich OPN23/OPN21, welche sich auch bereits in der RAP-PCR als effektivste erwiesen hatte. Für Zytokin-Arrays wurde zusätzlich die Kombination OPN21/US6 verwendet. Mit diesen Kombinationen konnten nahezu alle Fragmente detektiert werden, die auch mittels „klassischem“ cDNA-Array detektiert wurden. Alle Hybridisierungsexperimente wurden doppelt durchgeführt. Als Kontrolle wurde der „klassische“ cDNA-Array ohne Amplifizierung und die neue Kombination von RAP-PCR und cDNA-Array parallel mit derselben RNA von Fibroblasten von drei RA-Patienten durchgeführt. Alle Hybridisierungen zeigten im wesentlichen gleiche Ergebnisse (s. Abbildung 8).

Zusätzlich wurden 2 Fibroblastenkulturen von 2 Patienten mit RA über mehrere Passagen kultiviert und cDNA-Arrays durchgeführt, um die Konstanz der Genexpression zu überprüfen. Es stellte sich hierbei heraus, daß eine konstante Genexpression über 4-5 Passagen bei frisch isolierten Zellen erhalten blieb. Bei Zellen, die bereits eingefroren waren und wieder aufgetaut wurden, ließ sich eine

Stabilität nur über 3-4 Passagen nachweisen. Hierbei gab es jedoch individuelle Variationen, manche Fibroblastenpopulationen bewahrten ihr Expressionsprofil auch bis in höhere Passagen. In den Gentransfer-Experimenten wurden daher als zusätzliche Kontrolle nicht transduzierte Fibroblasten zum Zeitpunkt des Versuchsendes mit der Genexpression aus einer früheren Passage auf ihr Expressionsmuster hin verglichen.

Abbildung 8: Klassischer cDNA-Array (A) und Kombination RAP-PCR/cDNA-Array (B) mit demselben Ausgangsmaterial. Die kombinierte Methode visualisiert auch gering exprimierte Gene, die in (A) im Hintergrund nicht detektierbar sind (○ = c-myc, in (A) im Gegensatz zu (B) nicht detektierbar).



Aus diesen Versuchen ergab sich, daß folgende Bedingungen eingehalten werden mußten, um konstante cDNA-Array Ergebnisse zu erzielen:

- Isolierte Fibroblasten sollten nicht über mehr als 4-5 (frisch isolierte Zellen) bzw. 3-4 (aufgetaute Zellen) Passagen kultiviert werden.
- Es sollten immer möglichst gleiche Passagen miteinander verglichen werden.
- Die RNA sollte nach Lagerung bei -80°C möglichst selten aufgetaut und wieder eingefroren werden.
- Die Menge an eingesetzter RNA sollte zwischen 50-500 ng liegen.
- Die eingesetzte RNA-Menge sollte in zu vergleichenden Experimenten nicht variieren.

1.1.1 Differentiell exprimierte Gene im Vergleich von RA- vs. OA-Fibroblasten

Mittels der neu etablierten Methode aus RAP-PCR und cDNA-Array wurden 6 RA- mit 6 OA-Fibroblastenpopulationen verglichen. Verwendet wurden Onkogen/Tumor-Suppressor-Gen Array Membranen. Die Auswertung erfolgte mittels der AtlasImageTM 2.0 software. Von 190 gebundenen cDNAs auf den Array Membranen konnten ca. 102 Gene detektiert werden. Etwa 6 % der analysierten Gene waren

differentiell in synovialen RA- im Vergleich zu OA-Fibroblasten exprimiert. Die verbleibenden 98 Gene zeigten kein Hybridisierungssignal. In Tabelle 14 sind die differentiell exprimierten Gene aufgelistet. Von den 6 % differentiell exprimierten Genen wiesen 11 eine gesteigerte Expression in RA- vs. OA-Fibroblastenpopulationen auf; 4 Gene wiesen eine verringerte Expression auf. Nicht alle Gene waren in allen 12 Fibroblastenpopulationen differentiell reguliert. Gene, die in 6 vs. 5 Populationen differentiell reguliert waren, sind ebenfalls in Tabelle 14 aufgeführt.

Die statistische Analyse erfolgte mittels *t*-Test und darauffolgender Bonferroni-Korrektur (s. III.3.10). Gene, die diese statistische Signifikanzgrenze unterschritten, wurden als signifikant differentiell exprimiert angesehen (*). Gene, die über dieser Grenze liegen, müssen zusätzlich mittels anderer Methoden bestätigt werden.

Tabelle 14: Mittels RAP-PCR in Kombination mit cDNA-Array analysierte differentiell exprimierte Gene in RA-Fibroblastenpopulationen verglichen mit OA-Fibroblastenpopulationen

(A) Herunterreguliert RA- vs. OA- Fibroblastenpopulationen

cDNA (A)	Accession	Anzahl Ra vs. OA	Intensität RA	Intensität OA	p
Wachstumshemmer p33ING1	AF001954	5/6	27,7 ± 12,5	42,7 ± 5,4	0,033
Akt1; Protein Kinase B; c-Akt	M63167	6/6	33,5 ± 14,4	73,8 ± 18,1	0,002
Proto-Onkogen rhoA; GTP-bindendes Protein (rhoA)	L25080	6/5	9,7 ± 5,2	36,5 ± 16,7	0,006
mas Proto-Onkogen	M13150	6/6	15,2 ± 9,6	52,5 ± 12,3	0,00032*

Angeglichene Signifikanzgrenze: $p=0,00043$ nach Bonferroni-Korrektur

(B) Hochreguliert RA- vs. OA- Fibroblastenpopulationen

cDNA (B)	Accession	Anzahl Ra vs. OA	Intensität RA	Intensität OA	p
c-myc Onkogen	V00568	5/6	19,3 ± 8,0	5,2 ± 3,0	0,004
insulin-like growth factor I receptor (IGF1R)	X04434; M24599	6/6	686,5 ± 223,5	183,8 ± 91,5	0,001
DNA Reparatur Helikase ERCC3; TFIIH 89-kDa Untereinheit	M31899	6/6	79,0 ± 21,7	34,8 ± 9,9	0,002
ERBB-3 Rezeptor Protein-Tyrosin Kinase Vorläufer	M29366; M34309	5/6	18,5 ± 6,5	6,2 ± 2,9	0,003
CD82 Antigen	X53795	6/5	17,3 ± 4,6	7,0 ± 5,8	0,011
Notch 1	M99437	6/6	163,8 ± 30,2	101,8 ± 14,0	0,002
frizzled	L37882	6/6	35,3 ± 5,8	18,3 ± 2,5	0,00014*
CDC25B	M81934	6/6	113,0 ± 32,8	51,3 ± 7,5	0,002

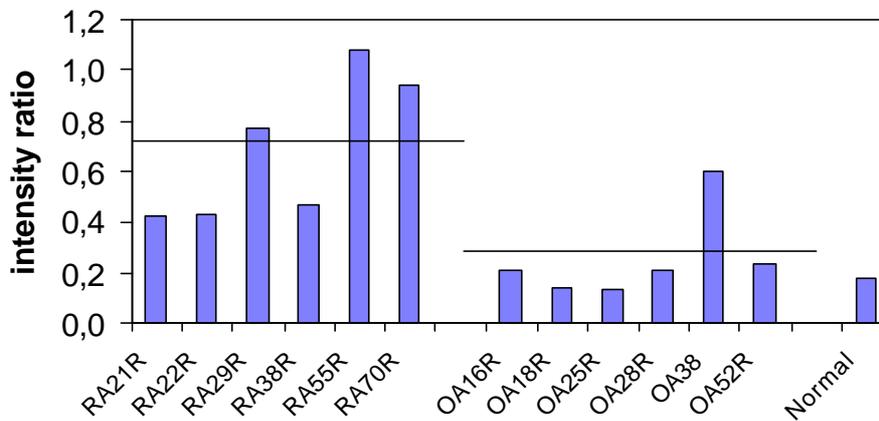
Angeglichene Signifikanzgrenze: $p=0,00043$ nach Bonferroni-Korrektur

1.1.1.1 Bestätigung der differentiellen Expression von *CD82* bzw. *c-myc*

A) Semiquantitative RT-PCR für *CD82*-mRNA

Aufgrund der interessanten Eigenschaften in Bezug auf die Pathogenese der RA wurde *CD82*-mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR (QuantumRNA™ PCR, s. III.3.4) nachgewiesen. Alle 6 RA-Populationen exprimierten mehr *CD82* als OA-Populationen, mit Ausnahme von OA38. Diese Ergebnisse entsprachen denen aus den cDNA-Array Experimenten (s. Abbildung 9).

Abbildung 9: Repräsentative semiquantitative RT-PCR für *CD82*-mRNA. Die entsprechenden Linien zeigen den Mittelwert aller 6 RA- bzw. aller 6 OA-Populationen an. Dargestellt ist die relative Menge *CD82*-mRNA im Verhältnis zur *18S*-RNA.

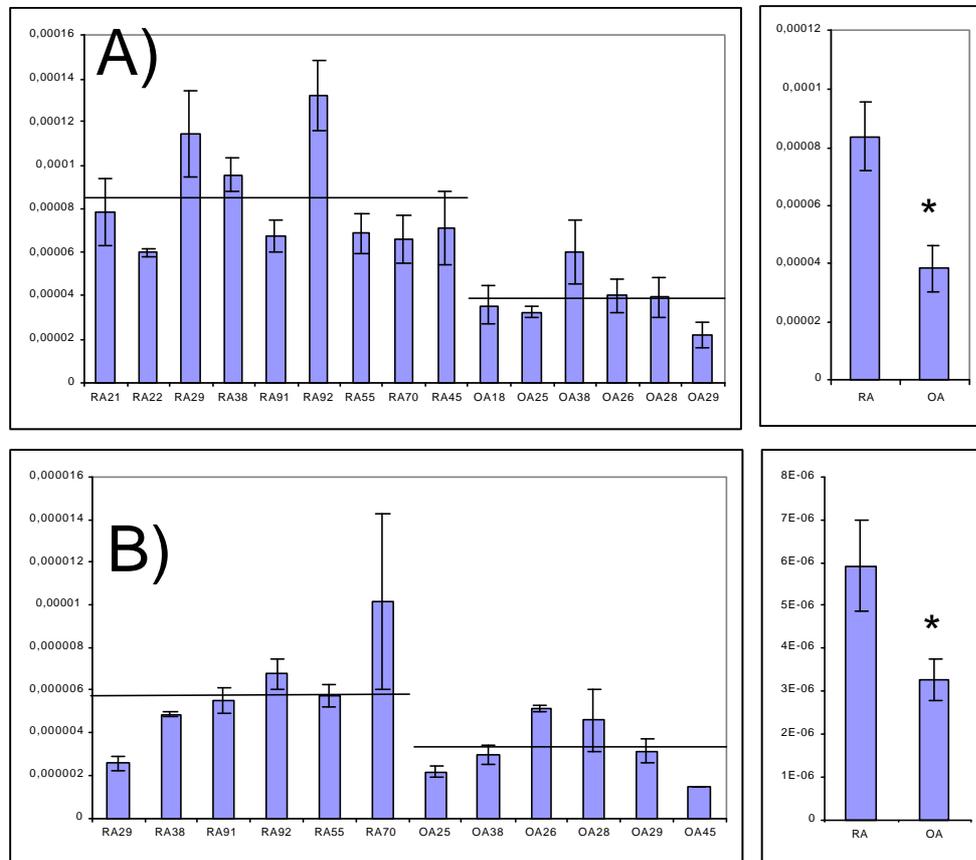


B) Realtime-PCR für *CD82*- und *c-myc*-mRNA

Die relative Quantifizierung für *CD82*-mRNA erfolgte bei 9 RA- im Vergleich zu 6 OA-Fibroblastenpopulationen. Alle RA-Populationen exprimierten mehr *CD82*-mRNA als die Fibroblasten von Patienten mit OA, mit Ausnahme von OA38 (s. Abbildung 10A).

Die Quantifizierung für *c-myc*-mRNA wies eine generelle Hochregulierung in RA- vs. OA- Fibroblastenpopulationen auf, mit Ausnahme einer RA-Population (RA29), in der *c-myc* geringer exprimiert war, als in zwei der OA-Populationen (s. Abbildung 10B).

Abbildung 10: Realtime-PCR für CD82-mRNA (A) und c-myc-mRNA (B). Das linke Diagramm zeigt die einzelnen Werte der RA- bzw. OA-Patienten. Das jeweils rechte Diagramm zeigt das Mittel aller RA- vs. OA-Fibroblasten mit signifikanten Unterschieden (ebenfalls dargestellt durch die Linien in den linken Diagrammen). Dargestellt ist jeweils die relative Menge (Verhältnis von 18S-RNA zum genspezifischen Amplifikat) der Proben-mRNA.



1.1.1.2 Nachweis von CD82 und p33ING1 Expression mittels *in situ* Hybridisierung

Die vermehrte *CD82*-mRNA Expression wurde mittels *in situ* Hybridisierung im Gewebe von 6 Patienten mit RA und 3 mit OA nachgewiesen. *CD82*-mRNA konnte in allen Fibroblastenkulturen nachgewiesen werden, vermehrt jedoch in RA-Fibroblasten (s. Abbildung 11). Nur ein OA-Gewebe wies vermehrt *CD82*-mRNA auf (OA38), was mit den Ergebnissen aus den cDNA-Arrays, den semiquantitativen RT-PCRs und den Realtime-PCRs auf mRNA-Ebene übereinstimmt. Zusätzlich wurde eine Doppelmarkierung zur Identifizierung der *CD82* exprimierenden Zellen mittels *in situ* Hybridisierung und anti-Fibroblasten-Ak Färbung mittels Immunohistochemie durchgeführt. Hierbei konnten *CD82*-exprimierende Zellen mit anti-Fibroblasten-Ak doppelmarkiert werden (s. Abbildung 12A). Neben *CD82* konnte auch *p33ING1* mittels *in situ* Hybridisierung in der synovialen Deckzellschicht als vermehrt exprimiert nachgewiesen werden (s. Abbildung 12B).

Abbildung 11: Nachweis von *CD82*-mRNA mittels *in situ* Hybridisierung im Synovium (schwarz): (A) und (B): 2 verschiedene OA-Patienten; (C) und (D) zwei verschiedene RA-Patienten. RA-Patienten exprimieren mehr *CD82*-mRNA als OA-Patienten. d= Deckzellschicht

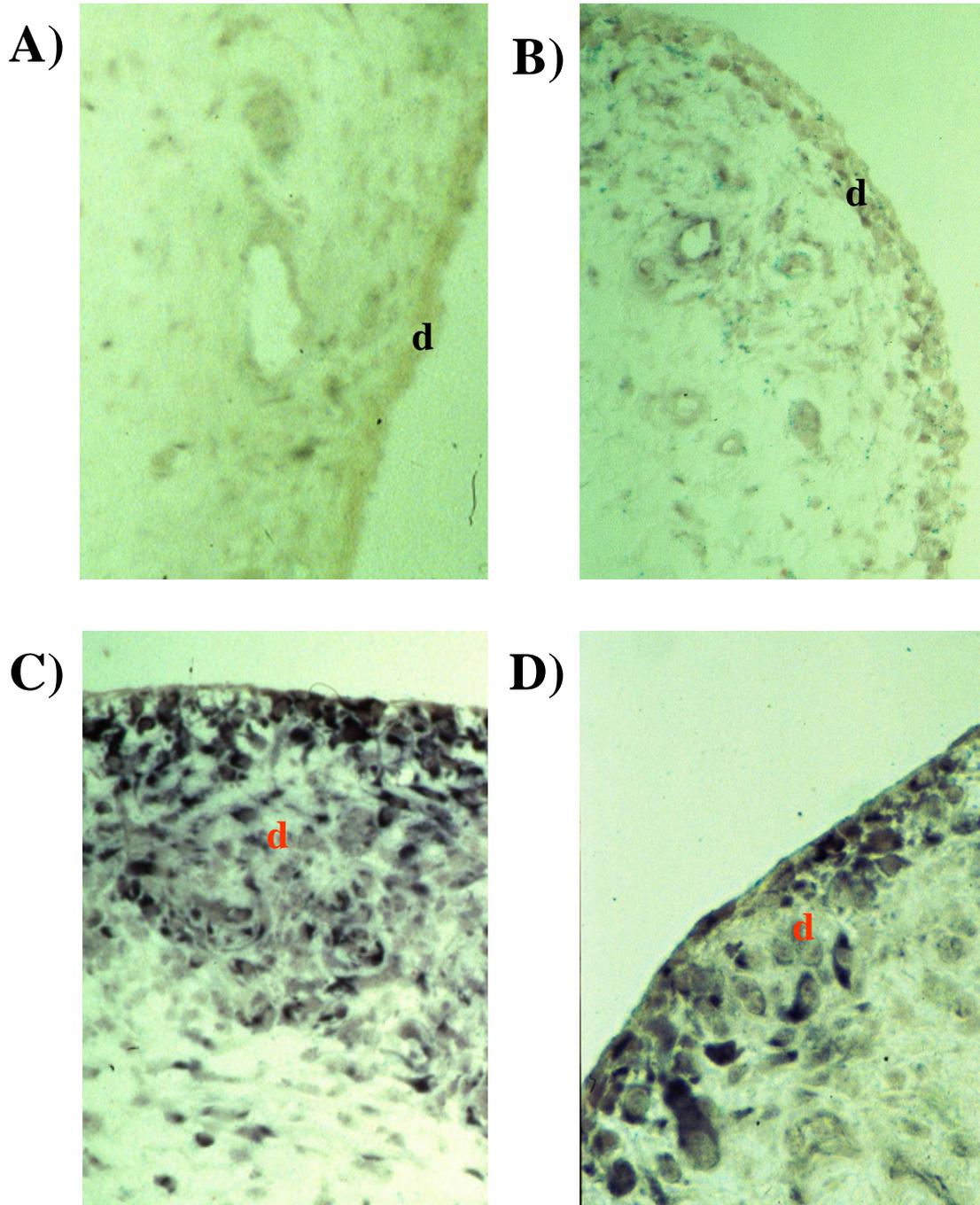
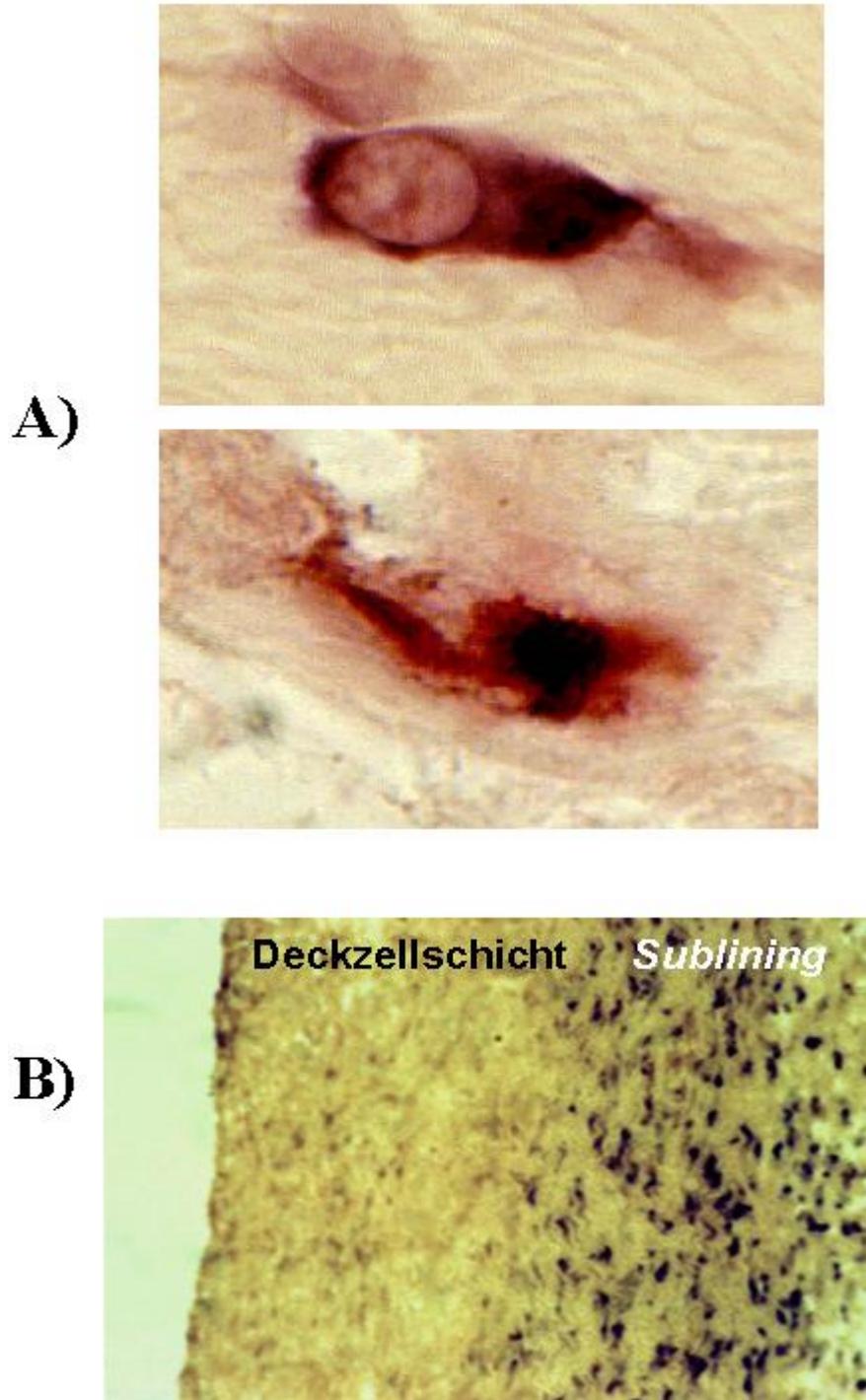


Abbildung 12: Nachweis von *CD82*- und *p33/ING1*-mRNA in synovialen RA-Fibroblasten. (A) Nachweis mittels *in situ* Hybridisierung von *CD82*-mRNA (schwarz) und Fibroblasten mittels Immunhistochemie (rot). (B) Nachweis von *p33/ING1*-mRNA v.a. im „Sublining“ des Synoviums (schwarz), im Gegensatz zu *CD82*-mRNA (s. Abbildung 11).



1.2 Etablierung der adenoviralen bzw. retroviralen Transduktion von synovialen Fibroblasten

Zunächst wurde die adenovirale bzw. retrovirale Transduktionseffizienz mittels β -Galaktosidase-Nachweis bestimmt. Transduzierte Zellen weisen hierbei nach erfolgreichem Gentransfer eine blaue Kernfärbung auf. Die Effizienz wurde aus dem Verhältnis transduzierter Zellen (blau) zu nicht transduzierten Zellen (ungefärbt) errechnet (s. Abbildung 13). Entsprechendes gilt für die grüne Fluoreszenz nach der Transduktion mit grün fluoreszierendem Protein (EGFP). Zunächst wurden verschiedene MOI für adeno- bzw. retroviralen Gentransfer getestet:

Adenoviren: 5-100 MOI

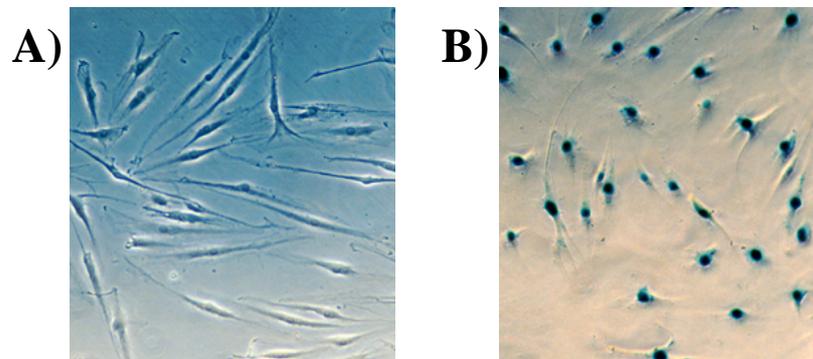
Retroviren: 5-500 MOI

Bezüglich der Transduktionseffizienz konnten folgende Transduktionsraten bestimmt werden (Angabe in x % transduzierte Zellen):

Adenoviren Ad5 Δ E1 Δ E3:	MOI 10: > 60 %
	MOI 20: > 75 %
	MOI 30: > 80 %
Adenoviren Ad5 Δ E1:	MOI 10: > 50 %
	MOI 20: > 70 %
	MOI 30: > 80 %
Retroviren:	MOI 50: > 10 %
	MOI 100: > 15 %
	MOI 200: \leq 30 %

Eine Transduktionseffizienz von 30 % bei retroviralen Vektoren konnte allerdings nur einmal nach zweifacher Transduktion (48 Stunden nach der ersten Transduktion) erzielt werden. Der Einsatz von höheren MOI führte zu keiner weiteren Verbesserung der Effizienz. Niedrigere MOI führten bei adenoviralen Vektoren zu Transduktionsraten von unter 50 %, bei retroviralen Vektoren waren nur noch vereinzelte Zellen pro Gesichtsfeld transduziert. Eingesetzt wurden – falls nicht anders angegeben – MOI von 20-30 für adenovirale und 200 für retrovirale Vektoren.

Abbildung 13: (A) LacZ transduzierte RA-Fibroblasten (Ad5 DE1) mit einer MOI von 30, (B) Nachweis mittels β -Galaktosidase-Färbung (blaue Kernfärbung)



Folgende Effizienzen in den Gentransfer-Experimenten mit sTNF RI, IL-10 und IL-1Ra konnten erzielt werden:

1. sTNF RI, IL-10 und/oder IL-1Ra: Für diese Transduktionsexperimente wurden ausschließlich adenovirale Konstrukte verwendet (s. III.2.2.1.1). Die *LacZ* und *EGFP* Genprodukte wurden nach parallel zu sTNF RI-Gentransfer in bis zu 85 % der Fibroblasten 48 Stunden nach Transduktion exprimiert, parallel zu den Kombinationen mit IL-10 und/oder IL-1Ra in bis zu 90 % der Zellen. Es konnten im Überstand 2554 ± 750 pg/ml (Mittel \pm SD) sTNF RI nachgewiesen werden. Nach 60 Tagen in der SCID-Maus konnten immer noch 57 ± 27 pg/ml sTNF RI im Serum der Mäuse gemessen werden. In allen Kontrollen sowie in den nicht transduzierten Implantaten und Zellen konnte keine sTNF RI-Produktion mittels ELISA nachgewiesen werden. Die durchschnittlichen Proteinkonzentrationen für die Kombinationen mit IL-10 und/oder IL-1Ra sind in Tabelle 15 aufgeführt.

2. IL-10 und/oder IL-1Ra: adenovirale (Ad5 Δ E1 Δ E3) oder mMLV MFG retrovirale Vektoren wurden verwendet (s. III.2.2.1.1). *LacZ* bzw. *EGFP* Genprodukte wurden in bis zu 90 % der Zellen 48 h nach Transduktion detektiert.

Der Gentransfer erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen: Mit IL-10 und IL-1Ra gemeinsam in einem 6-Loch, so daß eine Zelle sowohl IL-10 als auch IL-1Ra exprimieren kann, oder getrennt mit IL-10 bzw. IL-1Ra jeweils in einem 6-Loch und Implantierung der 1:1 gemischten Populationen (s. III.3.11). Die retrovirale Transduktion erfolgte nur getrennt. Die durchschnittlichen Proteinmengen sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Transduktionseffizienz nach Überexpression von IL-10 und/oder IL-1Ra

Vektor	Quelle	Insert	pg/ml Protein
adenoviral	Überstand	IL-10	628 ± 191
adenoviral	Überstand	IL-1Ra	1184 ± 115
adenoviral	Überstand	sTNF RI	2554 ± 750
retroviral	Überstand	IL-10	42 ± 14
retroviral	Überstand	IL-1Ra	23 ± 10
adenoviral	Überstand	IL-10 / IL-1Ra, separat	IL-10: 362 ± 100 IL-1Ra: 637 ± 217
adenoviral	Überstand	IL-10 / IL-1Ra, doppelt	IL-10: 511 ± 205 IL-1Ra: 1117 ± 504
adenoviral	Überstand	IL-10 / sTNF RI oder IL-1Ra / sTNF RI	IL-10: 412 ± 143 IL-1Ra: 542 ± 192 sTNF RI: 628 ± 230
adenoviral	Überstand	IL-10 / IL-1Ra / sTNF RI	IL-10: 320 ± 98 IL-1Ra: 380 ± 129 sTNF RI: 441 ± 215
adenoviral	Mausserum	IL-10	28 ± 14
adenoviral	Mausserum	IL-1Ra	59 ± 24
adenoviral	Mausserum	sTNF RI	57 ± 27
adenoviral	Mausserum	IL-10 / IL-1Ra	IL-10: 65 ± 21 IL-1Ra: 27 ± 5

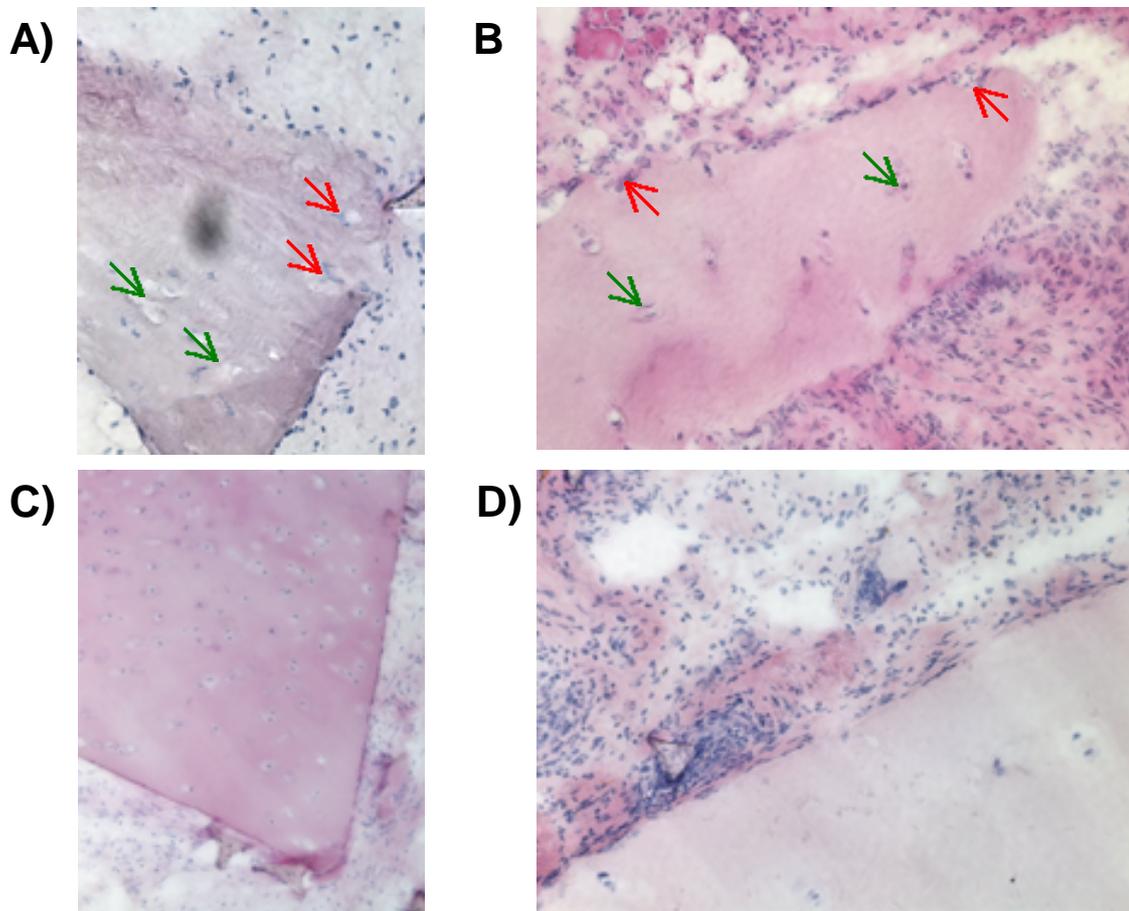
1.3 Etablierung des SCID-Maus-Modells

Humane synoviale RA-Fibroblasten invadieren und degradieren humanen Knorpel im SCID-Maus-Implantat (s. Abbildung 14A). Dies ist unabhängig vom Ort der Implantation (z.B. unter die Nierenkapsel oder unter die Haut).

Die Implantate kontroll-transduzierter Zellen (LacZ oder EGFP) von Patienten mit RA wiesen wie die Implantate nicht transduzierter Zellen eine starke Invasion und perichondrozytäre Knorpeldegradation auf (s. Abbildung 14B). Dies deutet darauf hin, daß die virale Transduktion keinen Einfluß auf das Verhalten der synovialen Fibroblasten bezüglich der Knorpeldestruktion nimmt.

Zellen anderen Ursprungs, wie humane Hautfibroblasten, synoviale Fibroblastenpopulationen von Patienten mit OA oder Zelllinien wie HT29 und HT-1080 invadieren den Knorpel minimal oder nicht (s. Abbildung 14C,D).

Abbildung 14: Mausimplantate mit Fibroblasten unterschiedlichen Ursprungs. (A) Implantat mit nicht transduzierten RA-Fibroblasten (starke Invasion und Degradation), (B) Implantat mit Kontroll-transduzierten RA-Fibroblasten (starke Invasion und Degradation) (C;D) Implantate mit Haut- bzw. OA-Fibroblasten (minimale Invasion und Degradation)



1.3.1 Immunhistochemischer Nachweis humaner Zellen an der Invasionszone

Um nachzuweisen, daß die adhärierenden und invadierenden Fibroblasten humanen und nicht murinen Ursprungs sind, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt (s. Abbildung 16A-B). Zusätzlich konnte mittels Immunhistochemie implantiertes Synovium (s. Abbildung 16C) im SCID-Maus-Implantat als human abgegrenzt werden, welches rein histologisch im Mikroskop nicht sicher von murinem Gewebe abzugrenzen war (s. Abbildung 16D-H). Es wurden folgende Zellen in den Implantaten nachgewiesen:

- A) Als Nachweis humaner Zellen wurden anti-humane β 2-Mikroglobulin-Ak verwendet. β 2-Mikroglobulin ist ein Protein, das mit MHC-Klasse I Molekülen

einen Antigen-präsentierenden Komplex auf der Zelloberfläche aller kernhaltigen Zellen bildet. Weiterhin wurden Fibroblasten-spezifische Ak verwendet (s. III.1.5). Humane MMP-13- und MMP-1-Ak dienten dem Nachweis von Matrix-abbauenden Zellen, da aktivierte synoviale Fibroblasten MMP synthetisieren und sezernieren (s. Abbildung 16A).

- B) Um murine invadierende Zellen auszuschließen, wurden Ak gegen den murinen I-A Komplex, einem murinen Homolog des MHC-Klasse I-Komplexes, verwendet. Zusätzlich wurde auch die gegen murinen IL-1 Rezeptor gerichteten Ak untersucht, da IL-1 Rezeptor von vielen Zellen gebildet und auf der Zelloberfläche präsentiert wird (s. Abbildung 16B).

Die invadierenden Zellen an der Knorpel/Zell-Grenze stellten sich als nahezu ausschließlich humanen Ursprungs heraus.

1.3.2 Immunzytochemie für IL-10 Rezeptor

Da nicht bekannt ist, ob synoviale Fibroblasten IL-10 Rezeptor exprimieren, wurde eine immunzytochemische Färbung mit synovialen RA-Fibroblasten durchgeführt. Als Positivkontrolle der Immunzytochemie diente ein humaner anti-Fibroblasten-Ak. Die RA-Fibroblasten exprimierten humanen IL-10 Rezeptor, jedoch lediglich in geringer Dichte.

Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von IL-10 Rezeptor auf synovialen RA-Fibroblasten. (A) IL-10 Rezeptor Ak, (B) anti-Fibroblasten Ak, (C) negativ-Kontrolle ohne Primärantikörper

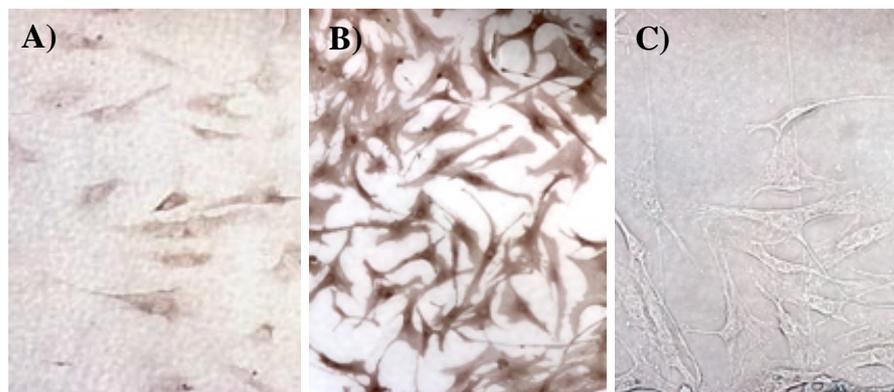
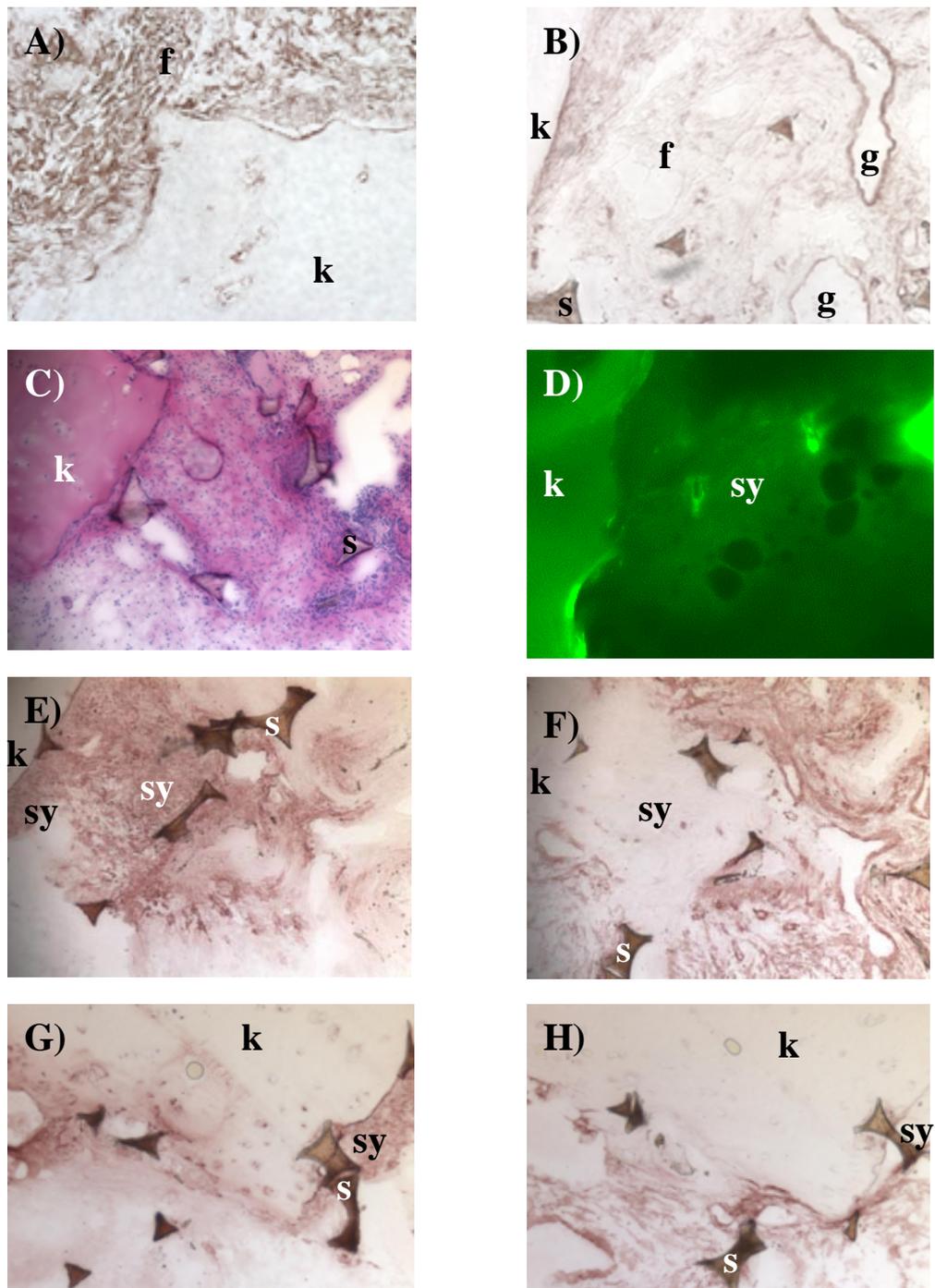


Abbildung 16: **Immunhistologischer Nachweis humaner Zellen an der Invasionszone** mit anti-MMP13-Ak (A). Nachweis muriner Zellen mit anti-Maus IL-1R-Ak (B). **Nachweis von humanem RA Synovium im SCID-Maus Implantat** (C), mittels Fluoreszenz-gekoppeltem Albumin (D), anti-human Fibroblasten-Ak (E). Nachweis murinen Gewebes mit anti-Maus IL-1R-Ak (F). Invasionszone mit anti-human Fibroblasten-Ak (G), bzw. anti-Maus IL-1R-Ak (H).
sy=Synovium; f=Fibroblasten; k=Knorpel; s=Schwamm; g=Blutgefäß



1.3.3 IL-6 ELISA mit SCID-Maus Seren

SCID-Mäuse können teilweise ihre Fähigkeit regenerieren, T- und/oder B-Lymphozyten zu bilden. Daher wurden möglichst junge Tiere verwendet und als Kontrolle für die Abwesenheit von T- und B-Zellen murines IL-6 gemessen. In keinem SCID-Maus-Serum konnte am Tag der Explantation murines IL-6 nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde humanes IL-6 mittels ELISA gemessen, um auszuschließen, daß humane Entzündungszellen mit synovialen Fibroblasten in SCID-Mäuse implantiert wurden. IL-6 lag in den Seren ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze .

2. Molekulare Effekte nach Gentransfer

2.1 Einzelner Gentransfer von sTNF RI, IL-10 oder IL-1Ra

Für den Gentransfer von sTNF RI wurden ausschließlich adenovirale Konstrukte verwendet (s. III.2.2.1.1). 5 Fibroblastenpopulationen von Patienten mit RA und 3 von OA-Patienten wurden analysiert. Mit den synovialen Fibroblasten zweier dieser Patienten wurden zusätzlich Stimulierungen und Überstandstransfer-Experimente durchgeführt.

Für den Gentransfer von IL-10 oder IL-1Ra wurden adenovirale (Ad5 Δ E1 Δ E3) oder mMLV MFG retrovirale Vektoren verwendet (s. III.2.2.1.1). Gewebe von 4 Patienten mit RA wurden in den folgenden Experimenten untersucht. Mit den synovialen Fibroblasten zweier dieser Patienten wurden ebenfalls Stimulierungen und Überstandstransfer-Experimente durchgeführt.

RAP-PCR in Kombination mit cDNA-Array wurde zur Analyse von differentiell exprimierten Genen verwendet. Nur Gene, die in allen Experimenten differentiell exprimiert waren, wurden ausgewertet.

2.1.1 Molekulare Veränderungen nach sTNF RI Gentransfer

Es wurden Zytokin- und Onkogen/Tumor-Suppressor-Gen Array Membranen verwendet. Generell waren 2–6 % der analysierten Gene nach sTNF RI Überexpression differentiell exprimiert. In Tabelle 16 sind die differentiell exprimierten Gene aufgelistet. Es konnte nach sTNF RI-Überexpression keine konstante

Expression von differentiell regulierten Genen in allen untersuchten Fibroblastenpopulationen detektiert werden (s. Tabelle 16).

Lediglich drei Gene waren in 3 verschiedenen Populationen differentiell exprimiert, wobei jedoch 2 dieser Gene in 2 RA- und einer OA-Population differentiell reguliert waren (*TRAIL Rezeptor*, *EB1*). 9 Gene wiesen in 2 Populationen eine konstante differentielle Genexpression auf, wobei hier 2 Gene in einer RA- und einer OA-Population differentiell reguliert waren (*MT-III*, *IL-1 α Vorläufer*). 8 bis 14 Zytokine und jeweils 5 bis 11 einzelne Onkogen/Tumor-Suppressor-Gene waren in jeweils einer RA-Fibroblastenpopulation differentiell exprimiert (Gene nicht aufgeführt).

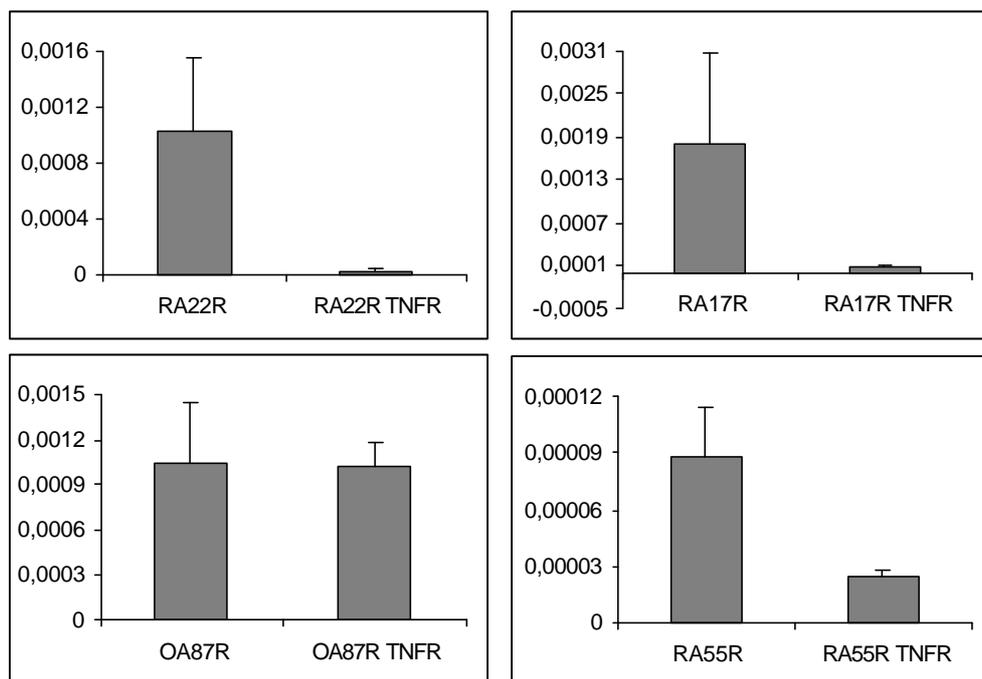
Tabelle 16: Differentiell exprimierte Gene nach sTNF RI Überexpression

cDNA	Accession	Regulation	Differentiell exprimiert in
„Growth hormone-dependent insulin-like growth factor-binding protein“	M31159 M35878	↓	RA55R, RA22R, RA17R
IL-1 α Vorläufer	X02851	↓	RA22R, OA45R
IL-2R β Untereinheit; CD122 Antigen	M26062	↓	RA21R, RA17R
Thymosin beta-10 (THYB10)	M92381	↓	RA21R, RA17R
„related to receptor tyrosine kinase“ (RYK)	S59184	↓	RA55R, RA22R
Inhibin A-Untereinheit	M13981	↓	RA22R, RA17R
C-myc bindendes Protein	D89667	↓	RA55R, RA17R
axl Onkogen, Tyrosin-Protein Kinase Rezeptor UFO Vorläufer	M76125	↓	RA21R, RA17R
„Ets-related protein tel“	U11732	↓	RA55R, RA22R
„Cytotoxic ligand TRAIL receptor“	U90875	↑	RA55R, RA22R, OA45R
EB1	U24166	↑	RA70R, RA22R, OA45R
Metallothionin-III (MT-III)	M93311	↑	RA55R, OA45R

2.1.1.1 Nachweis von differentiell exprimierten Genen mittels Realtime-PCR

Die differentielle Expression eines Proto-Onkogenes, *axl*, wurde exemplarisch mittels Realtime-PCR nachgewiesen. Die Expression von *axl* variierte in den untersuchten RA- und OA-Patienten stark. 2 der 5 untersuchten Patienten wiesen eine starke Herunterregulierung von *axl*-mRNA nach sTNF RI Überexpression auf, was mit den Ergebnissen aus dem cDNA-Array übereinstimmt (s. Abbildung 17).

Abbildung 17: Realtime-PCR für *axl*-mRNA. In RA22R- und RA17R-Fibroblasten ist die Expression von *axl* stark herunterreguliert. Die Expression von *axl* variiert bei den einzelnen Patienten jedoch sehr stark.

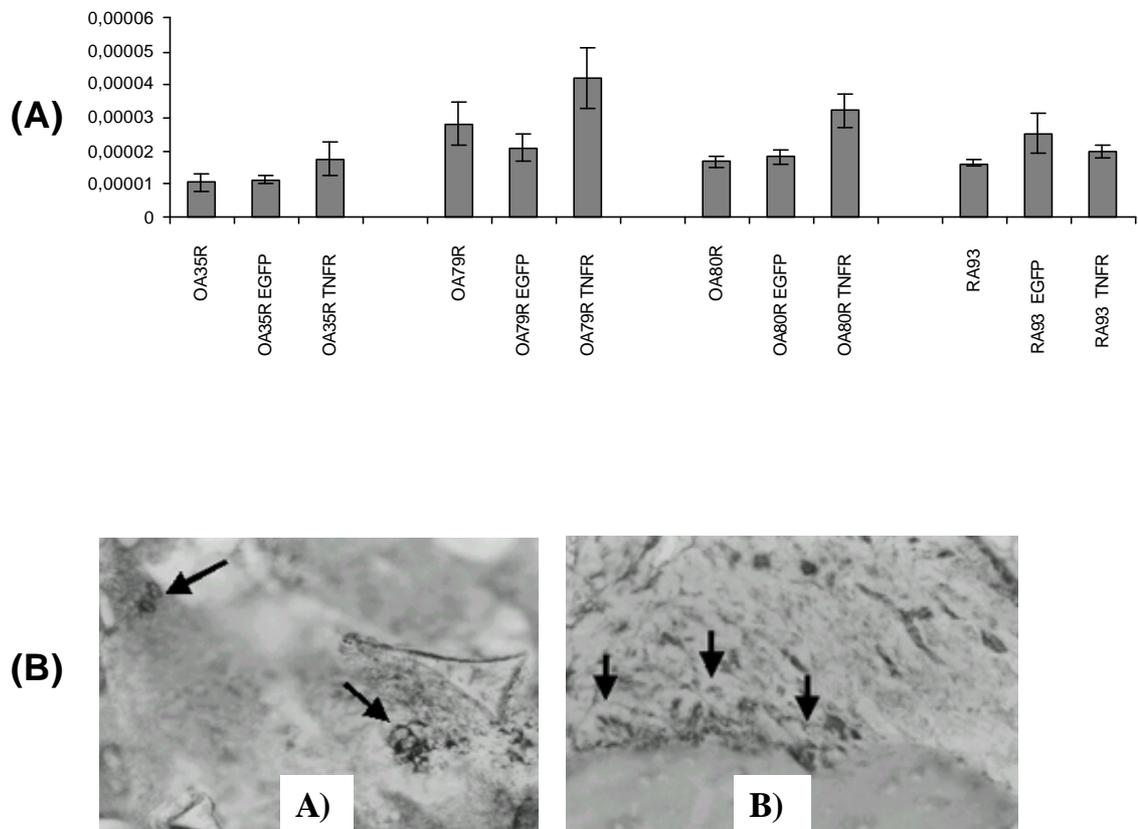


2.1.1.2 Analyse von *PTEN*, *p38δ* und Komplementfaktoren nach *sTNF RI*

Überexpression

Als mögliche Wirkungs- oder Effektormechanismen wurden die Expression des Tumor-Suppressor-Gens *PTEN*, der Signaltransduktions-Kinase *p38δ* und verschiedener Komplementfaktoren, deren Relevanz für die RA bereits beschrieben wurden (Pap et al., 2000; Cocolakis et al., 2001), untersucht. Weder *PTEN* noch *p38δ* zeigten einen signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression in der Realtime-PCR im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 18). Die Komplementfaktoren C3a, C5a, C3aR und C5aR konnten in den *sTNF RI* überexprimierenden Implantaten mittels Immunhistochemie vermehrt nachgewiesen werden (Abbildung 18).

Abbildung 18: Realtime-PCR zum Nachweis von *PTEN*-mRNA. (A) Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und transduzierten Zellen nachgewiesen werden. **(B)** Immunhistologischer Nachweis von C5aR in nicht transduzierten A) und sTNF RI B) überexprimierenden synovialen RA-Fibroblasten eines Implantats.



2.1.2 Molekulare Veränderungen nach *IL-10* oder *IL-1Ra* Gentransfer

Parallel zu den Transduktionsexperimenten wurden Zellen derselben Populationen von zwei Patienten mit RA mit äquivalenten Konzentrationen von *IL-10* oder *IL-1Ra* stimuliert, bzw. der Überstand der transduzierten Zellen auf nicht transduzierte Zellen übertragen und parallel kultiviert. Für die cDNA-Arrays wurden Zytokin- und Onkogen/Tumor-Suppressor-Gen Membranen verwendet. Mehrere Tumor-Suppressor-Gene, Zytokine, Zytokinvorläufer und -rezeptoren, sowie in MMP-Regulation und in Entzündung involvierte Gene waren differentiell exprimiert (s. Tabelle 17).

2.2 Doppelter Gentransfer

Gewebe von 4 Patienten mit RA wurden verwendet. Mit den synovialen Fibroblasten zweier dieser Patienten wurden zusätzlich Stimulierungen und Überstandstransfer Experimente durchgeführt (s. III.2.1.8;III.2.2.4). Die Kombinationen von IL-10 oder IL-1Ra mit sTNF RI wurden adenoviral durchgeführt. Die Kombination von IL-10 und IL-1Ra erfolgte sowohl adeno- als auch retroviral. Der adenovirale Gentransfer von IL-10 und IL-1Ra erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen:

- A) Getrennte Transduktion von synovialen RA-Fibroblasten mit IL-10 bzw. IL-1Ra. Nach Nachweis der Proteinexpression wurden die Zellpopulationen 1:1 gemischt, weiter gemeinsam kultiviert und anschließend implantiert.
- B) Transduktion von synovialen RA-Fibroblasten mit IL-10 und IL-1Ra in einer 6-Loch-Platte. Die Zellen wurden kultiviert und anschließend implantiert.

2.2.1 Molekulare Veränderungen nach Doppelgentransfer mit IL-10 bzw. IL-1Ra mit sTNF RI

Mittels Kombination von RAP-PCR und cDNA-Array wurden differentiell exprimierte Onkogen/Tumor-Suppressor-Gene und Zytokine analysiert. Es konnte kein konstantes Expressionsprofil für die analysierten Gene ermittelt werden. Jeder Patient für sich zeigte zwar ein stabiles Expressionsmuster über sämtliche durchgeführten Versuche (Stimulierung, Transduktion, Überstandsübertrag), es konnten jedoch keine in allen Patienten und allen Versuchen übereinstimmenden Gene gefunden werden.

2.2.2 Molekulare Veränderungen nach IL-10 und IL-1Ra Doppelgentransfer

Es wurden Zytokin- sowie Onkogen/Tumor-Suppressor-Gen Array Membranen verwendet. Wie unter IV:2.1 beschrieben, wurden als Kontrollen Überstandstransfer- und Stimulierungsexperimente durchgeführt und ebenfalls RNA für cDNA-Arrays gewonnen. Die RNA der transduzierten Zellen wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten isoliert: bei 2 Patienten 4 Tage nach Transduktion, d.h. 48 h nach Nachweis der überexprimierten Proteine und bei 4 Patienten 14 Tage nach Transduktion. Pro Array waren 3-5 % der Gene differentiell reguliert, dies entspricht 8-14 Genen der jeweiligen RA-Populationen.

In Tabelle 17 sind die differentiell exprimierte Gene 14 Tage nach Transduktion aufgelistet. Besonders auffallend war die differentielle Expression bestimmter Gene, die mit dem Molekül Aktivin in Verbindung stehen. Hiervon waren *Aktivin A* Untereinheit, *Follistatin* und *FRP* („follistatin related protein“) verringert exprimiert, *Inhibin* vermehrt exprimiert sowie die Tumor-Suppressor-Gene *p16INK4* und *p33ING1* verringert exprimiert. Weiterhin zeigten sich verschiedene Interleukine, Interleukinvorläufer und -rezeptoren differentiell exprimiert. Weiterhin waren Chemokin-assoziierte Gene differentiell exprimiert, unter anderem *RANTES* Protein Vorläufer und *CC Chemokin Rezeptor Typ 1*. Im Gegensatz dazu waren Gene wie z.B. *BMP-2a*, *BMP-5* und *EMMPRIN* („extracellular matrix metalloproteinase inducer“) hochreguliert, welche vor allem im Matrix-Stoffwechsel eine wesentliche Rolle spielen.

Interessanterweise wurde in den cDNA-Arrays mit RNA, die bereits 4 Tage nach Transduktion isoliert wurde, *Aktivin A* Untereinheit, *p16INK4* und *p33ING1* vermehrt exprimiert vorgefunden. Verringert exprimiert war hingegen *EMMPRIN*. Bei allen anderen Genen entsprach das Expressionsmuster dem der cDNA-Arrays nach 14 Tagen.

Tabelle 17: Differentiell exprimierte Gene nach IL-10 und/oder IL-1Ra Überexpression

cDNA	Regulation [Mittel ± SD]					Signifikanz UT vs. Dopp.
	untransd. (UT)	EGFP	IL-10	IL-1Ra	Doppelt	
IL-1 α Vorläufer	18,1± 2,2	19,0± 3,8	141,1± 6,9	277,3±15,8	330,6±19,6	0.0005827
IL-4 Vorläufer	10,7± 4,7	17,3± 2,8	305,1±11,0	390,7±14,3	437,6± 9,4	0.0000001
IL-4 Rezeptor α Untereinheit	22,6± 7,7	13,9± 5,2	110,1± 8,9	145,3± 8,6	147,3± 5,0	0.0000001
IL-5 Rezeptor α Untereinheit	673,7±96,4	496,3± 53,4	58,4± 6,1	139,0± 9,0	103,0±11,4	0.0000001
IL-10 Rezeptor	4,7± 2,8	4,0± 2,4	242,1±13,3	328,1± 8,6	347,3± 9,8	0.0000001
RANTES Protein Vorläufer	1358,4±54,1	1275,0± 84,7	486,6±11,0	545,7±28,2	848,4±62,3	0.0000001
CC Chemokin Rezeptor Typ 1	49,7± 3,8	47,6± 5,5	11,0± 6,9	7,3± 5,0	3,9± 2,6	0.0000001
BMP 2A	1,6± 2,1	4,3± 5,1	317,3±14,0	338,7±18,3	281,7±12,7	0.0000001
BMP 5	5,7± 4,9	5,6± 5,8	49,1± 3,9	59,1± 2,9	75,9± 6,3	0.0000001
EMMPRIN	23,6± 5,0	16,7± 5,1	355,0± 3,3	76,9± 8,1	96,3± 6,4	0.0000001
Inhibin α Untereinheit	5,8± 6,1	5,0± 5,1	70,0±14,1	197,6±16,3	152,3±14,0	0.0000001
Aktivin A Untereinheit	54,4±10,8	64,7± 10,6	41,3± 5,7	35,0± 6,8	17,4± 7,2	0.0000148
Follistatin	72,1± 9,0	77,6± 8,0	63,0± 7,4	53,0± 7,9	24,9± 7,5	0.0000004
FRP	1260,9±98,1	1326,9±282,9	1113,4±95,6	1057,29±80,4	537,6±74,4	0.0000001
p16INK4	152,4±15,0	150,6± 12,0	129,3± 8,9	88,0± 9,8	49,8± 7,6	0.0000001
p33ING1	204,9±19,9	221,4± 9,9	173,9±23,3	149,4±20,7	77,4±11,9	0.0000001

2.2.2.1 Bestätigung der differentiellen Expression mittels Realtime-PCR

Aktivin- und *Follistatin*-mRNA wurde mittels ELISA und Realtime-PCR quantifiziert.

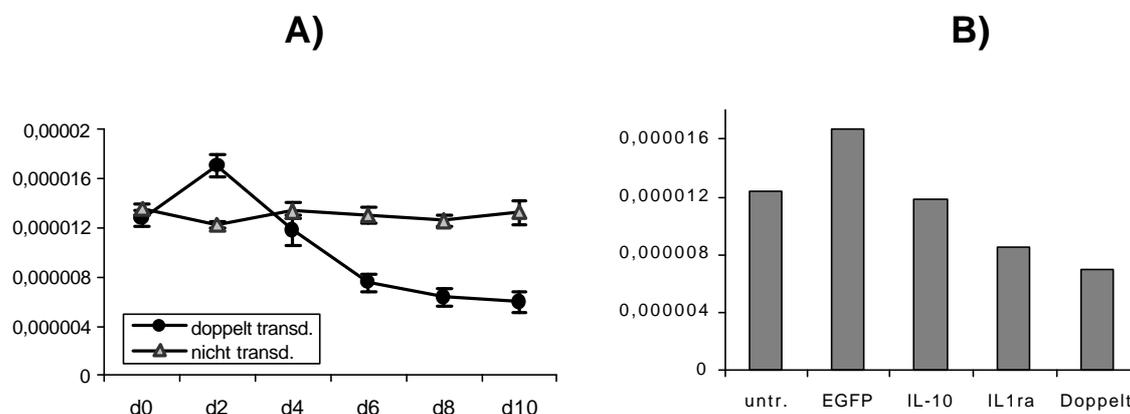
A) Aktivin: Mittels ELISA wurde zunächst festgestellt, daß synoviale RA-Fibroblasten 48 Stunden nach Transduktion erhöhte Aktivinspiegel aufwiesen. Diese Spiegel fielen nach wenigen Tagen unter die Ausgangsmenge von Aktivin ab und waren entsprechend am Tag der Implantatentnahme aus der SCID-Maus und zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung für die zweiten cDNA-Arrays verringert exprimiert.

Dieser Zeitverlauf wurde daher auf RNA- (Realtime-PCR) und Proteinebene (ELISA) nachvollzogen. 48 Stunden nach Transduktion und jeweils alle 2 Tage wurde ein 12-Loch der parallel kultivierten und transfizierten Zellen geerntet, die RNA isoliert und Realtime-PCR Experimente durchgeführt, bzw. der Überstand abgenommen und ELISAs durchgeführt (s. Abbildung 19).

B) Auch für Follistatin wurde über mehrere Tage der Spiegel im Überstand transduzierter Fibroblasten gemessen. Follistatin zeigte eine verringerte Expression 48 Stunden nach Transduktion. Diese blieb bis auf einen kurzen Anstieg 4 Tage nach Transduktion und folgendem Abfall unter die Ausgangsmenge vor Transduktion bis zur RNA-Isolierung für cDNA-Arrays konstant verringert.

Als Beispiel ist hier ein Patient mit verschiedenen Transduktionskombinationen dargestellt (s. Abbildung 19).

Abbildung 19: Realtime-PCR für *Aktivin*- und *Follistatin*-mRNA. A) *Aktivin* zu verschiedenen Zeitpunkten, Tag 0 entspricht Tag der Transduktion und B) für *Follistatin* für einen Patienten mit RA, mit verschiedenen Zytokinkombinationen transduziert



2.3 Dreifacher Gentransfer von sTNF RI, IL-1Ra und IL-10

Fibroblasten von 4 Patienten mit RA wurden für die folgenden Experimente verwendet. Mit den synovialen Fibroblasten zweier dieser Patienten wurden zusätzlich Stimulierungen und Überstandstransfer-Experimente durchgeführt. Die verwendeten viralen Konstrukte für den Dreifachgentransfer waren Ad5 $\Delta E1\Delta E3$ Adenoviren (s. III.2.2.1.1).

2.3.1 Molekulare Veränderungen nach IL-10/IL-1Ra/sTNF RI Gentransfer

Zur Analyse von differentiell exprimierten Onkogen/Tumor-Suppressor-Genen und Zytokinen wurde die Kombination von RAP-PCR und cDNA-Array verwendet. Wiederum konnte nach dreifachem Gentransfer kein signifikant konstantes Expressionsprofil bei den analysierten Gene ermittelt werden. Auch hier zeigte jeder Patient für sich ein stabiles Expressionsmuster in den durchgeführten Versuchen, es konnte jedoch keine Übereinstimmung in allen Versuchen zwischen den Patienten gefunden werden.

3. Effekte von Gentransfer auf Knorpeldestruktion

3.1.1 Effekte auf Knorpeldestruktion nach sTNF RI Gentransfer

Überexpression von sTNF RI in RA-Fibroblasten hatte keine signifikante Veränderung der Knorpeldegradation und -invasion zur Folge. OA-Fibroblasten wiesen interessanterweise eine erhöhte Invasion und Degradation des Knorpels nach sTNF RI Überexpression auf (s. Abbildung 20; Tabelle 18).

Abbildung 20: Mausimplantate nach sTNF RI Überexpression. (A) Implantat mit sTNF RI überexprimierenden OA-Fibroblasten (starke Invasion und Degradation), (B) RA-Fibroblasten mit sTNF RI Überexpression (starke Invasion und Degradation).

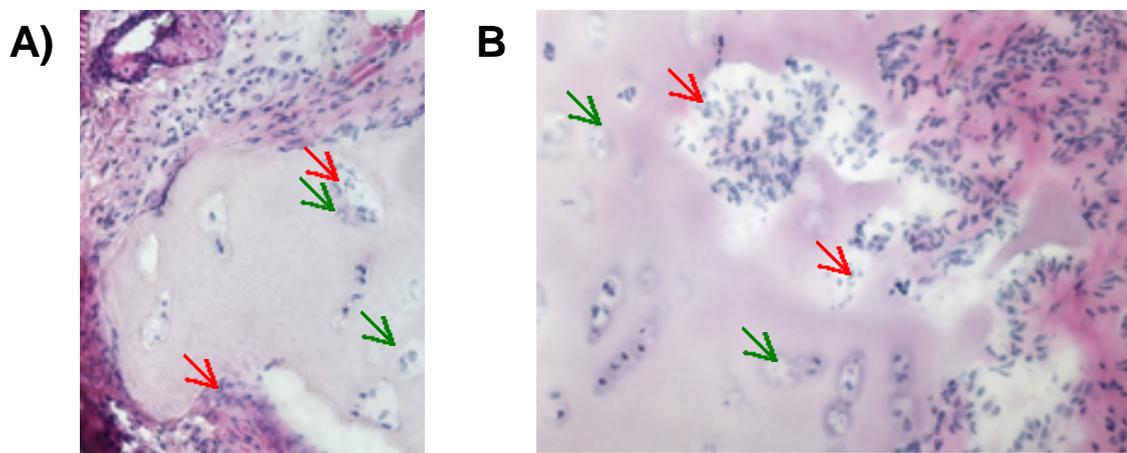
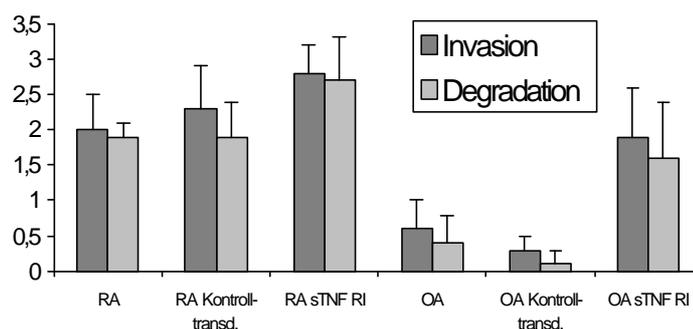


Tabelle 18: Invasions- und Degradationsscores nach sTNF RI Überexpression und graphische Darstellung der Scores

Implantat	Invasion (Mittel \pm SD)	Degradation (Mittel \pm SD)
RA nicht transduziert	2,0 \pm 0,5	1,9 \pm 0,2
RA Kontroll-transduziert	2,3 \pm 0,6	1,9 \pm 0,5
RA sTNF RI transduziert	2,8 \pm 0,4	2,7 \pm 0,6
OA nicht transduziert	0,6 \pm 0,4	0,4 \pm 0,4
OA Kontroll-transduziert	0,3 \pm 0,2	0,1 \pm 0,2
OA sTNF RI transduziert	1,9 \pm 0,7	1,6 \pm 0,8



3.1.2 Effekte auf Knorpeldestruktion nach IL-10 oder IL-1Ra Gentransfer

Nicht transduzierte Fibroblasten wiesen eine intensive Knorpelinvasion ($2,8 \pm 0,2$) und perichondrozytäre Knorpeldegradation ($2,6 \pm 0,3$) auf (s. Abbildung 21A). Die Kontroll-transduzierten Fibroblasten zeigten ebenfalls intensive Invasion ($2,6 \pm 0,6$) und Degradation ($2,4 \pm 0,4$) (s. Abbildung 21B).

Die Überexpression von IL-10 resultierte in einer reduzierten Invasion ($0,3 \pm 0,2$), hatte jedoch keinen Effekt auf die Knorpeldegradation ($2,4 \pm 0,2$) (s. Abbildung 21C). Gentransfer von IL-1Ra resultierte in einer Reduzierung der Degradation ($0,7 \pm 0,6$) nicht aber der Invasion ($2,9 \pm 0,2$) (s. Abbildung 21D). Die Scores sind in Tabelle 19 zusammengefaßt.

3.1.3 Effekte auf Knorpeldestruktion nach Gentransfer von IL-10 bzw. IL-1Ra mit sTNF RI

Die Knorpelinvasion und -degradation war nach Transduktion mit IL-10 oder IL-1Ra kombiniert mit sTNF RI nicht signifikant verringert. Tendenziell konnten protektive Effekte, die auch durch Einzelgentransfer von IL-10 oder IL-1Ra bewirkt wurden, festgestellt werden, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen ($p < 0,09$). Interessanterweise zeigte sich eine Tendenz in Richtung der protektiven Effekte von IL-10 bzw. IL-1Ra alleine, jedoch variierten die protektiven Eigenschaften zwischen den Patienten so stark, daß keine Signifikanz in den durchgeführten Experimenten erreicht werden konnte.

3.1.4 Effekte auf Knorpeldestruktion von IL-10 und IL-1Ra

Der doppelte Gentransfer von IL-10 und IL-1Ra, unabhängig ob separat (vergleiche IV.2.2A) oder gemeinsam mit IL-10 und IL-1Ra in einem 6-Loch transduziert (vergleiche IV.2.2B), resultierte in einer statistisch signifikanten Hemmung der Knorpelinvasion und -degradation des Knorpels (s. Abbildung 21, Tabelle 19).

Abbildung 21: SCID-Maus Implantate eines Patienten mit RA: A) nicht transduziert und B) LacZ-transduziert mit starker **I**nvasion und **D**egradation; C) IL-10 transduziert (verringerte **I**nvasion); D) IL-1Ra transduziert (verringerte **D**egradation); E) Separat IL-10 und IL-1Ra transduziert, bzw. F) doppelt IL-10 und IL-1Ra transduziert mit minimaler **I**nvasion und **D**egradation.

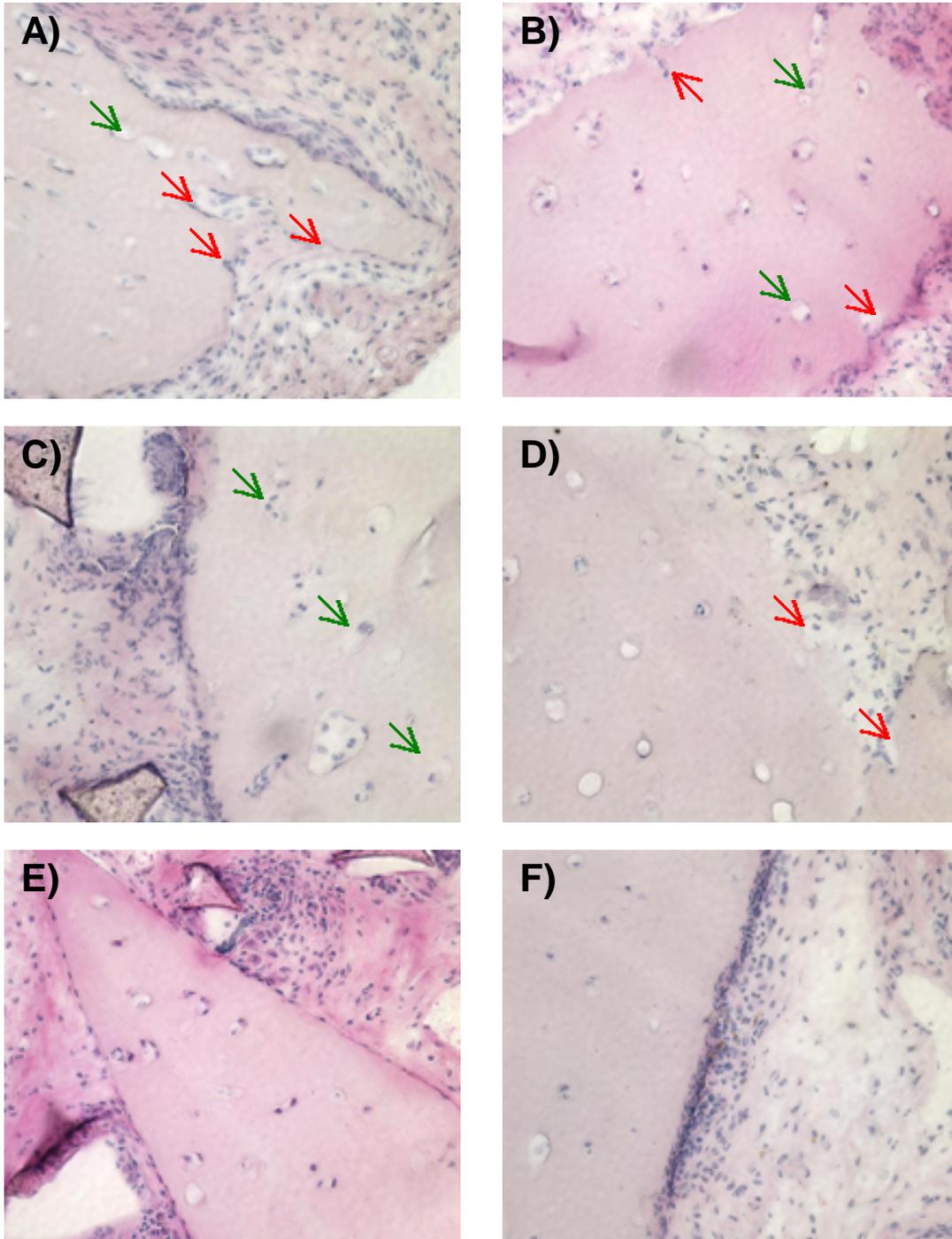
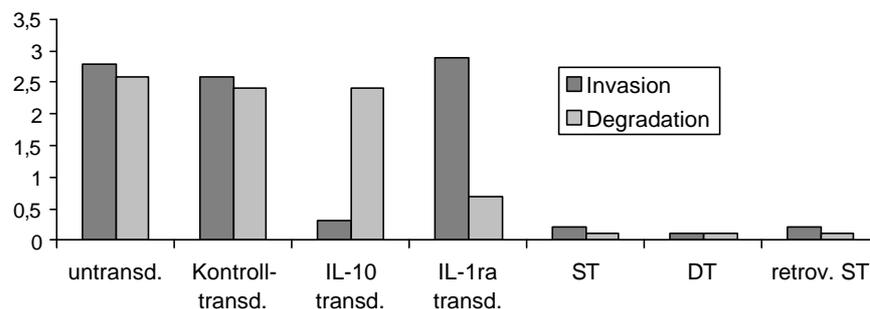


Tabelle 19: Invasions- und Degradationsscores nach Gentransfer (Mittel \pm SD) und graphische Darstellung der Scores.

RA-Implantat	Invasionsscore	Degradationsscore
Nicht transduziert	2,8 \pm 0,2	2,6 \pm 0,3
Kontroll-transduziert	2,6 \pm 0,6	2,4 \pm 0,4
IL-10 transduziert	0,3 \pm 0,2*	2,4 \pm 0,2
IL-1Ra transduziert	2,9 \pm 0,2	0,7 \pm 0,6*
separat doppelt transduziert (ST)	0,2 \pm 0,2*	0,1 \pm 0,2*
doppelt transduziert (DT)	0,1 \pm 0,2*	0,1 \pm 0,2*
retroviral doppelt transduziert	0,2 \pm 0,4	0,1 \pm 0,2*

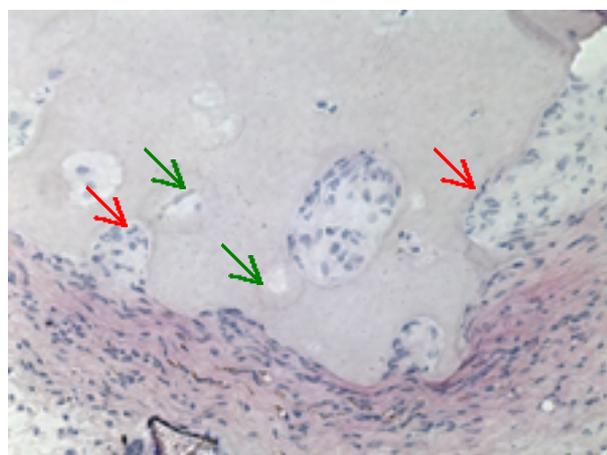
* Signifikant ($p < 0.05$) im Vergleich zu nicht transduzierten und Kontroll-transduzierten Implantaten



3.1.4.1 Effekte auf Knorpeldestruktion nach IL-10/IL-1Ra/sTNF RI Gentransfer

Der dreifache Gentransfer von IL-10, IL-1Ra und sTNF RI resultierte in einer statistisch signifikanten Knorpelprotektion (Invasion: $1,6 \pm 0,3$; Degradation $1,7 \pm 0,2$). Die Knorpelprotektion war allerdings weniger effektiv als nach doppeltem Gentransfer von IL-10 und IL-1Ra (s. Tabelle 19).

Abbildung 22: Implantat mit dreifachem Gentransfer von IL-10, IL-1Ra und sTNF RI. Darstellung eines Implantats nach dreifachem Gentransfer mit deutlicher Invasion und Degradation (\rightarrow Invasion, \rightarrow Degradation).



V. DISKUSSION

Veränderungen in Synovialzellen, unter anderem die vermehrte Produktion von Wachstumsfaktoren und Matrix-degradierenden Enzymen sowie die vermehrte Expression von Proto-Onkogenen, tragen zur progressiven Destruktion der betroffenen Gelenke in der RA bei (Müller-Ladner et al., 1995; Müller-Ladner et al., 1998). Bisher ist jedoch wenig über die molekularen Grundlagen in Bezug auf den aggressiven Phänotyp synovialer Fibroblasten von Patienten mit RA bekannt. Daher ist es von wesentlicher Bedeutung, potentiell protektive Effekte von Genen bzw. deren Genprodukten hinsichtlich Knorpelprotektion oder -schädigung sowohl histologisch als auch auf molekularer Ebene zu analysieren. Daneben ist es entscheidend, eventuelle Interaktionen mit physiologisch wichtigem Matrixumbau oder anderen gelenkprotektiven Vorgängen zu erfassen bzw. auszuschließen. Um die Zusammenhänge zwischen molekularen Veränderungen und potentiell gelenkprotektiven Effekten mit dem Gewebematerial desselben Patienten untersuchen zu können, mußten jedoch zunächst geeignete Methoden und eine sowohl molekularbiologische als auch histologische Strategie etabliert werden.

1. Etablierung der Techniken

1.1 Etablierung der cDNA-Array Technik

Im Gegensatz zu schnell wachsenden Tumorzellen können synoviale Fibroblasten und deren RNA nur in wesentlich geringeren Mengen isoliert werden. Weiterhin stellte sich heraus, daß diese Zellen nur über eine begrenzte Anzahl von Passagen kultiviert werden können, bevor phänotypische und/oder Veränderungen des Wachstumsverhaltens auftreten. Um jedoch mehrere Versuche mit demselben RNA-Ausgangsmaterial parallel durchführen zu können (s. Abbildung 7), mußte eine sensitive Methode entwickelt werden, welche die Analyse differentiell exprimierter Gene mit nur wenig RNA ermöglicht.

Mehrere molekularbiologische Techniken, wie z.B. "differential display" oder subtraktive Hybridisierung, werden zur Zeit zur Analyse differentiell exprimierter Gene in verschiedenen Geweben oder unter verschiedenen biologischen Bedingungen verwendet (Lisitsyn et al., 1993; Mathieu-Daude et al., 1996; Diatchenko et al., 1996; Trenkle et al., 1999). Diese Techniken werden ebenfalls

angewendet, um molekulare Veränderungen in der Pathogenese der RA zu analysieren (Aicher et al., 1994; Firestein et al., 1997; Mangasser-Stephan et al., 1997; Seki et al., 1998). Die Vorteile dieser Techniken beinhalten die Analyse einer großen Anzahl von Genen, Vergleich von mehreren biologischen Bedingungen und hohe Effizienz bezüglich Analyse differentieller Genexpression. Die Nachteile beinhalten falsch-positive Ergebnisse, einen hohen Zeitaufwand für Klonierung und Charakterisierung der Gene und einen großen Bedarf an RNA.

Die Technik der cDNA-Array Hybridisierung ist vor allem dann von Vorteil, wenn verschiedene biologische Bedingungen oder mehrere Gewebe miteinander verglichen werden sollen (Usui et al., 1996) und wurde deshalb vor allem im Bereich der Onkologie zum Vergleich des Genexpressionsmusters von gesundem mit Tumorgewebe verwendet (Oh et al., 1999; Wellmann et al., 2000). Konventionell hergestellte Arrays können tausende cDNA Klone aus verschiedenen Gengruppen enthalten. Die Expressionsmuster sämtlicher Gene können in einer einzigen Hybridisierung analysiert werden (Sehgal et al., 1998; Trenkle et al., 1998). Werden differentiell regulierte Gene mittels cDNA-Array identifiziert, stehen entsprechend die Sequenzen, die dieses Transkript repräsentieren, in der GeneBank[®] zur Verfügung. Die Einsatzmenge an RNA pro Array ist jedoch hoch und liegt im µg-Bereich, zusätzlich können nur die häufigsten Transkripte sichtbar gemacht werden (s. Abbildung 8; Boll et al., 1986). Nur durch Erhöhung der eingesetzten Menge an RNA könnten auch geringer exprimierte Transkripte mittels cDNA-Array analysiert werden, diese ist jedoch bei vielen Experimenten nicht verfügbar.

Eine Möglichkeit, mRNA zu amplifizieren, ist der RNA-Fingerprint (RAP-PCR McClelland et al., 1994). Seit dessen Einführung 1992 (Welsh et al., 1992) wurden mehrere Variationen dieses Verfahrens beschrieben (Liang et al., 1992). Die Methode stellte sich als effizient und reproduzierbar für verschiedenste experimentelle Bedingungen heraus (Vogt et al., 1997). Nach dem Fingerprint muß das Produkt jedoch aus dem Gel isoliert und sequenziert werden, bevor die differentielle Expression mittels anderer Methoden verifiziert werden kann.

Bei der Kombination von cDNA-Array, in unserem Versuchsansatz von Atlas[™] human cDNA Expressionsarray, mit der RAP-PCR steht die Sequenz des differentiell exprimierten Gens direkt zur Verfügung (Trenkle et al., 1998).

Der Vergleich zwischen der kombinierten Technik und dem Standard-Atlas[™] cDNA Expressionsarray zeigte, daß nach Optimierung der Primer in RT und PCR

identische Expressionsmuster erzielt werden konnten (s. Abbildung 8). Alle Experimente mit der kombinierten Technik wurden in zwei unabhängigen Versuchen wiederholt und wiesen identische Ergebnisse auf. Somit konnte eine sensitive Expressionsanalyse-Strategie entwickelt werden, bei der pro Experiment lediglich 50-500 ng anstelle von 2-5 µg RNA benötigt werden (s. Abbildung 6).

1.1.1 Analyse der differentiellen Expression von synovialen RA- vs. OA-Fibroblasten

Mit der neu etablierten kombinierten Methode wurden zunächst gezielt Gene analysiert, welche zum transformiert erscheinenden Phänotyp dieser Zellen beitragen können (Müller-Ladner et al., 1995), vor allem Proto-Onkogene und Tumor-Suppressor-Gene. Verwendet wurden Onkogen/Tumor-Suppressor-Gen Arrays zur Analyse der Genexpressionsmuster von 190 Onkogenen und Tumor-Suppressor-Genen.

Neben der geeigneten Technik sind die Vergleichszellen, welche zur Analyse differentiell exprimierter Gene herangezogen werden, ebenfalls von essentieller Bedeutung, da diese möglichst einem gesunden Phänotyp entsprechen sollten. Synoviale Fibroblasten aus gesunden Gelenken sind jedoch sehr schwierig zu erhalten. Daher werden diese Versuche meist mit synovialen Fibroblasten von Patienten mit Osteoarthritis, welche im SCID-Maus-Experiment keinen knorpeldestruktiven Phänotyp aufweisen, durchgeführt (s. Abbildung 14). Weiterhin muß gewährleistet sein, daß die Zellen im Laufe der Zellkultur keine Veränderung ihres Expressionsmusters aufweisen (s.o.). Aus diesem Grund wurden verschiedene Passagen von Fibroblastenkulturen mittels cDNA-Array miteinander verglichen. Wie sich herausstellte, können nur frühe Passagen für die Experimente verwendet werden (s. IV.1.1.1).

Mittels der kombinierten Methode konnte festgestellt werden, daß etwa 6 % der analysierten Gene differentiell in RA- im Vergleich zu OA-Fibroblasten exprimiert werden (s. Tabelle 14). Einige der differentiell exprimierten Gene wurden bereits für die RA beschrieben und konnten als Kontrolle für die Methode angesehen werden. Diese beinhalten das *c-myc* Proto-Onkogen, welches in der RA in vielen untersuchten Patienten als hochreguliert beschrieben ist (Gay et al., 1989; Hashiramoto et al., 1999). „*Insulin-like growth factor*“ (IGF) und *IGF 1 Rezeptor*

waren vermehrt in synovialen Fibroblasten exprimiert, ihre Rolle bei der Knochenbildung, bei Reparaturmechanismen von Gelenkknorpel sowie die Effekte auf Fibroblastenwachstum, Überleben und Transformation sind für die RA bereits intensiv untersucht und beschrieben worden (Keyszer et al., 1995; Middleton et al., 1995). *Frizzled*, ein embryonischer Wachstumsfaktor, wurde ebenfalls als vermehrt exprimiert in RA gefunden (Sen et al., 2000). Auch *FAST* Kinase ist in RA-Fibroblasten vermehrt exprimiert; ihre Rolle bei der Fas-medierten Apoptose wurde durch Tian et al. (1995) und Kobayashi et al. (1999) dargelegt. *Semaphorin E* wurde vor kurzem mittels „differential display“ und subtraktiver Hybridisierung als differentiell exprimiert identifiziert und dessen immunsuppressive Rolle wurde in die Pathophysiologie der RA integriert (Mangasser-Stephan et al., 1997; Seki et al., 1998).

Insgesamt lassen sich die differentiell exprimierten Gene in folgende Kategorien, deren Bedeutung für die RA teilweise bekannt ist, unterteilen:

1. Proliferation und Wachstum: *ErbB-3* gehört zu der epithelialen Wachstumsfaktor-Rezeptorfamilie und wird in epithelialen Erkrankungen überexprimiert (Aaronson et al., 1990). *CDC25B*, welches in Zellproliferation und Signaltransduktion involviert ist, war herunterreguliert in RA-Fibroblasten (Baldin et al., 1997). Ebenfalls verringert exprimiert war das Tumor-Suppressor-Gen *p33/ING1*, welches in die Proliferation verschiedener Zellen involviert ist (Garkavtsev et al., 1998). Der Transkriptionsfaktor IID (TFIID) ist bei Zellproliferation und Differenzierung von Bedeutung (Dimri et al., 1994; Purrello et al., 1998). Zusätzlich scheint TFIID in den hochkomplexen Notch-Stoffwechsel involviert zu sein (Selkoe, 2000).
2. Proliferation und Differenzierung: *Notch1* konnte vermehrt in RA-Fibroblasten exprimiert gefunden werden. Die Funktion von Notch1 ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Es ist in die Differenzierung bipotenter Vorläufer in bestimmte Zelltypen, z.B. T-lymphatische vs. B-lymphatische Reihe (Pui et al., 1999), in die Thymozytendifferenzierung und die Proliferation von T-Zell-Subtypen involviert (Joutel et al., 1998).
3. Reparaturmechanismen: Die Untereinheit ERCC3 (“excision repair cross-complementing type 3”) des TFIIH-Komplexes ist ein DNA-Reparaturprotein.

ERCC3 war vermehrt in synovialen RA-Fibroblasten exprimiert, eventuell durch erhöhten Zellstoffwechsel und -wachstum im Synovium bedingt (Lu et al., 1997).

4. Apoptose: *Akt1*, welches in RA-Fibroblasten verringert exprimiert war, ist beteiligt an durch IGF-1-initiiertes Proliferation und Apoptose (Ahmad et al., 1999).
5. Adhäsion und Migration: Die GTPase rhoA ist involviert in die Aufhebung der Zell-Zell-Adhäsion, die Aktivierung der Zellbewegung und die Bildung von Stressfasern durch Aktivierung von beta1-Integrinen und Herunterregulierung von Cadherin und Catenin (Gimond et al., 1999). Dies könnte zur Invasivität von Fibroblasten in den Knorpel beitragen.

CD82, ein Gen das bisher nicht in Zusammenhang mit RA gebracht wurde, ist im Rahmen dieser Arbeit mittels verschiedener Methoden auf verstärkte Expression in synovialen RA-Fibroblasten hin überprüft worden (s. Abbildung 9-12). Es lässt sich nicht ohne weiteres in die oben aufgeführten Kategorien einordnen, da es viele verschiedene Funktionen erfüllt. *CD82* interagiert oder stimuliert interessanterweise einige Mechanismen, die in der RA aktiv sind. *CD82* gehört zu der Tetraspan Superfamilie. Mitglieder dieser Familie formen Komplexe mit Integrinen wie $\alpha4\beta1$, dessen Bezug zur RA bekannt ist (Rinaldi et al., 1997; Serru et al., 1999). Die Expression von *CD82* korreliert mit dem reduzierten metastatischen Potential von einigen Tumoren (Lagaudriere-Gesbert et al., 1997). *CD82* induziert ebenso wie andere Mitglieder der Tetraspan Superfamilie die Aggregation von Zellen und inhibiert deren Migration (Lagaudriere-Gesbert et al., 1997). *CD82* liefert kostimulatorische Signale, die für die Induktion von zellulärer Proliferation, die Aktivierung von T-Zellen und die Erhöhung von T-Zell/APZ-Interaktionen notwendig sind (Shibagaki et al., 1998). Es scheint ebenfalls in die Differenzierung von B- und anderen Zellen involviert zu sein (Levy et al., 1998).

CD82 ist in RA überexprimiert und könnte daher in zelluläre Interaktionen sowie Erhöhung der Adhäsionsmolekül-Expression in der synovialen Deckzellschicht involviert sein, wie es kürzlich für die bidirektionale Interaktion von VLA-4 mit Fibronectin Variante CS-1 und VCAM-1 beschrieben wurde (Müller-Ladner et al., 1997a).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß insbesondere Gene, die an der Entstehung der Hyperplasie der Deckzellschicht in der RA beteiligt sein könnten, differentiell exprimiert sind: Gene, die Proliferation und Differenzierung induzieren können, sind hochreguliert und Proliferationshemmer sind herunterreguliert. Durch den gesteigerten Zellstoffwechsel der synovialen RA-Fibroblasten könnten auch vermehrt DNA-Reparaturmechanismen benötigt werden. Weiterhin ist die Apoptose in synovialen RA-Fibroblasten verringert und Adhäsionsmoleküle werden vermehrt exprimiert. Die Zellen der Deckzellschicht können daher verstärkt an Knorpel bzw. Knochen adhären, wodurch Pannusbildung und Invasion in den Knorpel letztendlich erst ermöglicht werden.

1.2 Etablierung des Gentransfers in synoviale Fibroblasten

Um potentiell protektive Effekte von Zytokinen und Zytokinhemmern zu analysieren, müssen diese Gene über den gesamten Versuchszeitraum in den Zielzellen in ausreichender Menge exprimiert werden.

Die vorliegende Studie zeigt, daß adenovirale Vektoren verwendet werden können, um über einen längeren Zeitraum mehrere Gene mit ausreichender Effizienz zu exprimieren. Die Beobachtung, daß stabile Serumspiegel von IL-1Ra, vIL-10 und sTNF RI über 60 Tage nach Gentransfer erzielt werden konnten, zeigt, daß adenovirale Vektoren die gewünschte Langzeit-Transgenexpression für Studien anhand eines geeigneten Tiermodells gewährleisten können (s. IV.1.2). Zusätzlich konnten in diesem Versuchsansatz durch ebenfalls durchgeführte Stimulierungen und retrovirale Transduktion adenoviral medierte Nebeneffekte ausgeschlossen werden (s. IV.2; Evans et al., 1996; Müller-Ladner et al., 1997b).

1.3 Etablierung histologischer Techniken

Da synoviale Fibroblasten *in vitro* nur über eine limitierte Anzahl von Passagen kultiviert werden können (s. IV.1.1.1) und Knorpel nur über wenige Tage außerhalb des menschlichen Körpers überleben kann, wurde das SCID-Maus-Modell der RA zur Analyse von Veränderungen bezüglich Knorpeldestruktion verwendet. Diese Methode wurde durch Einführung einer neuen Implantationstechnik unter die Haut optimiert. Die Vorteile dieser Methode sind: Je 2 Implantate pro Maus, mehr Zellen pro Implantat, das Genprodukt ist im Serum der Mäuse nachweisbar. Die neue

Implantierungstechnik führte hierbei zu denselben Ergebnissen hinsichtlich der Knorpeldestruktion wie in der vorher verwendeten Implantation unter die Nierenkapsel. Die histologische Auswertung wurde mittels eines konstant verwendeten „Scores“ durchgeführt, so daß das Verhalten der unterschiedlich transduzierten Fibroblasten in Bezug den Knorpel über alle Versuche vergleichbar dargestellt werden konnte.

2. Gentransfer von Zytokinen und Zytokinhemmern

Viele proinflammatorische und chemotaktische Zytokine sind im RA-Synovium in hohen Konzentrationen vorhanden und im Vergleich zum normalen Gelenk und anderen Arthritiden dysreguliert. Von speziellem Interesse sind hierbei jene Zytokine, die als Basis einer inflammatorischen Antwort gelten. Hierzu gehören $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-6. Studien, die sich mit Zytokinen und Zytokininhibitoren in Tiermodellen der Arthritis und in Patienten mit RA beschäftigten, wiesen auf die zentrale Rolle dieser Zytokine in der Pathogenese der RA hin (Williams et al., 1992; Campion et al., 1996; Moreland et al., 1996; Joosten et al., 1997). Von besonderem Interesse sind daneben Moleküle, welche die Aktivität dieser Zytokine hemmen, unter anderem zytokinspezifische Antikörper (Elliott et al., 1993), lösliche Rezeptormoleküle (Arend et al., 1994; Moreland et al., 1996) und Rezeptorantagonisten (Arend, 1993).

$\text{TNF}\alpha$ und IL-1 sind die zentralen inflammatorischen Zytokine in der Pathogenese der RA (Probert et al., 1995) und bieten sich daher als Ziele für Therapien dieser Erkrankung an. Tiermodelle, in denen $\text{TNF}\alpha$ inhibiert wurde, zeigten nicht nur eine Verringerung der Entzündung, sondern auch der Knochenerosion. Für den Transfer zum Menschen ist daher von Bedeutung, molekulare Mechanismen, die durch Modulation von $\text{TNF}\alpha$ bewirkt werden, zu analysieren. Studien mit RA-Patienten zeigten, daß nicht jeder Patient von einer anti- $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung profitierte. Obwohl die antiarthritischen Effekte von anti- $\text{TNF}\alpha$ -Therapien intensiv studiert wurden, konnte die etablierte, progressive Erkrankung auch hierdurch nicht komplett supprimiert werden. Daher wurden in dieser Arbeit insbesondere die molekularen Effekte der $\text{TNF}\alpha$ -Hemmung bezüglich Knorpelinvasion und -degradation durch synoviale Fibroblasten von Patienten mit RA sowie parallel dazu die differentiell exprimierten Gene nach entsprechender Inhibierung analysiert, um spezifisch assoziierte Stoffwechselwege zu identifizieren.

IL-10 und IL-1Ra sind wegen ihrer antiinflammatorischen und gelenkprotektiven Eigenschaften von weitreichendem Interesse als therapeutische Agenzien. Klinische Studien mit IL-1Ra bei der humanen RA zeigten vorteilhafte Effekte in Bezug auf die Progressionsrate der Knorpeldestruktion sowie auf die Unterdrückung der Entzündungsaktivität (Bresnihan, 2001), allerdings fehlen adäquate Daten aus

klinischen Studien mit IL-10 zur Behandlung von RA. Kürzlich konnte weiterhin gezeigt werden, daß sowohl IL-1Ra als auch IL-10 verschiedene Aspekte (Degradation bzw. Invasion) der Knorpeldestruktion im SCID-Maus-Modell der RA inhibieren können (s. Tabelle 19; Müller-Ladner et al., 1997b; Müller-Ladner et al., 1999), was die Testung eines Doppelgentransfers von IL-1Ra und IL-10 nahelegte. Zusätzlich war angesichts der guten klinischen Wirkung der anti-TNF α -Therapie die Frage zu klären, ob Kombinationen mit TNF α -Inhibitoren bessere Ergebnisse hinsichtlich Knorpelprotektion aufweisen würden. Das experimentelle Design ist in Abbildung 7 dargestellt.

2.1 Molekulare Gentransfer-Effekte

Die molekularen Effekte von einzelem, doppeltem und dreifachem Gentransfer von IL-10, IL-1Ra und sTNF RI in verschiedenen Kombinationen wurden mittels RAP-PCR und cDNA-Array analysiert und können in folgende Ergebnisgruppen eingeordnet werden:

2.1.1 Einzelner Gentransfer

A) *TNF α -Blockade mit sTNF RI*: Insgesamt waren 2-6 % der analysierten Gene nach TNF α -Blockade in RA-Fibroblasten differentiell exprimiert (s. Tabelle 16). Individuelle molekulare Veränderungen der einzelnen Patienten wiesen auf potentiell antiinflammatorische bzw. knorpelprotektive Effekte hin, es zeigte sich jedoch keine konstante Veränderung bei allen Patienten. Lediglich manche Patienten zeigten identische Veränderungen des Genexpressionsmusters nach TNF α -Inhibierung (s. Tabelle 16):

Proto-Onkogene und assoziierte Gene wurden hierbei nach sTNF RI Überexpression tendenziell herunterreguliert: Das *c-myc-bindende Protein*, welches bekannterweise in der RA hochreguliert ist (Hashiramoto et al., 1999); das *axl* Proto-Onkogen, welches in mehreren Tumoren und in der Deckzellschicht von Patienten mit RA detektiert werden konnte (O'Donnell et al., 1999); der Transkriptionsfaktor *TEL*, welcher möglicherweise in Gefäßbildung, Zellwachstum und in zellulärer Transformation bei der humanen Leukämie involviert ist (Lacronique et al., 2000); *RYK*, das Zellwachstum und zelluläre Transformation

reguliert (Katso et al., 1999) und *Thymosin beta-10*, welches in Zellwachstum und -differenzierung involviert ist (Santelli et al., 1999).

Tumor-Suppressor-Gene waren hochreguliert: *EB1*, dessen Interaktion mit dem APC-Protein bei „adenomatous polyposis coli“ (APC) notwendig für die Tumor-Suppressor-Aktivität dieses Proteins ist, war in RA-Patienten hochreguliert (Jais et al., 1998); Metallothionin III (MT-III), auch wachstumsinhibitorischer Faktor genannt, hat inhibitorische Effekte auf das Wachstum von kortikalen Neuronen und ist in verschiedenen Tumoren herunterreguliert (Garrett et al., 1999).

Apoptose und Wachstumsfaktoren: TRAIL ist involviert in die Induktion von Apoptose, Entzündungsinhibierung und Zellzyklus-Progression (Song et al., 2000). IGF und IGF 1 Rezeptor sind in die Regulation der Knochenbildung und in Reparaturmechanismen von Gelenkknorpel involviert; sie beeinflussen auch das Wachstum von Fibroblasten, ihr Überleben und ihre Transformation (Keyszer et al., 1995).

B) *IL-1-Blockade mittels IL-1Ra, bzw. IL-10 Überexpression:*

Mehrere Tumor-Suppressor-Gene, Zytokine, Zytokinvorläufer und -rezeptoren sowie in MMP-Regulation und Entzündung involvierte Gene waren differentiell exprimiert nach IL-1Ra oder IL-10 Überexpression. Die Gene wiesen tendenziell protektive Effekte hinsichtlich Knorpeldegradation auf, auch antiinflammatorische Effekte waren zu dokumentieren (s. Tabelle 17).

2.1.2 Doppelter Gentransfer

A) *Gentransfer von sTNF RI mit IL-10 oder IL-1Ra:* Bereits beim einzelnen Gentransfer von sTNF RI wurde ersichtlich, daß die Inhibierung von $TNF\alpha$ nicht zu einer eindeutigen Veränderung des Expressionsmusters bei allen vier untersuchten Patienten führte. Dies steht im Gegensatz zu den Monogentransfer-Studien mit IL-10 oder IL-1Ra (s. Tabelle 17) und spiegelt sich auch bei den Kombinationsstudien mit sTNF RI im inkonstanten Expressionsmuster wieder. Die Kombination mit IL-10 oder IL-1Ra zeigte daher eher die knorpelprotektiven Effekte von IL-10 bzw. IL-1Ra als sTNF RI-Effekte.

B) *Doppelter Gentransfer von IL-1Ra und IL-10:* Interessanterweise waren lediglich 2-5 % der untersuchten Zytokine, Proto-Onkogene und Tumor-Suppressor-Gene in synovialen RA-Fibroblasten nach Blockade von IL-1 und Überexpression von IL-10 differentiell exprimiert (s. Tabelle 17). Von diesen Genen waren

verschiedene Tumor-Suppressor-Gene, welche in Proliferation und Wachstumsinhibition involviert sind, hochreguliert. Dieser Effekt war besonders stark 2-10 Tage nach Transduktion zu beobachten und reduzierte sich dann unter den Basiswert (s. IV.2.2.2). Weitere identifizierte Gene sind in Matrixregulierung und Freisetzung von degradierenden Enzymen verwickelt. Mehrere Gene, die in Beziehung zu Aktivin stehen, waren ebenfalls differentiell exprimiert (s. V.3). Tendenziell waren somit Gene differentiell exprimiert, die Knorpeldegradation und Entzündung deutlich entgegenwirken können.

2.1.3 Dreifacher Gentransfer

Dreifacher Gentransfer mit IL-10, IL-1Ra und sTNF RI führte zu keiner konstanten Veränderung des Genexpressionsmusters bei allen untersuchten Patienten. Es konnten zwar individuelle protektive Effekte bei den einzelnen Fibroblastenpopulationen festgestellt werden, dieses Muster zeigte sich jedoch nicht bei allen Patienten gleichermaßen. Möglicherweise führt die Modulation von IL-1Ra bzw. IL-10 und TNF α , jeweils Zytokine mit sehr vielfältigen Funktionen neben ihren Eigenschaften bei der Entzündung, zur Inhibierung wichtiger, gelenkprotektiver Stoffwechselwege, so daß die protektive Wirkung des doppelten Gentransfers von IL-10 und IL-1Ra nicht erreicht werden konnte.

Zusammenfassend erwies sich der doppelte Gentransfer von IL-10 und IL-1Ra zur Verhinderung der Knorpeldestruktion als der Effektivste. Zudem konnten mehrere Gene identifiziert werden, die spezifisch der Entzündung und der Knorpeldegradation entgegen wirken (s. V.3)

2.2 Auswirkungen des Gentransfers auf die Knorpeldestruktion

Mit Hilfe des SCID-Maus-Modells kann das langfristige Verhalten von humanen synovialen RA-Fibroblasten bezüglich Knorpel analysiert werden, was wegen der limitierten Überlebensdauer dieser Komponenten in der Kultur nicht möglich ist. Dies wird dadurch ermöglicht, daß SCID-Mäuse nicht in der Lage sind, humane Zellen abzustößen, da sie weder T- noch B-Zellen besitzen und somit als „lebendes Reagenzglas“ dienen. Mit Hilfe des SCID-Maus-Modells der RA konnten

insbesondere auch die histologischen Effekte des Gentransfers bezüglich Knorpeldestruktion analysiert werden (Versuchsdesign s. Abbildung 7).

2.2.1 Einzelner Gentransfer

- A) *TNF α -Blockade mit sTNF RI*: Obwohl potentielle protektive antiinflammatorische und antiproliferative Effekte innerhalb der individuellen Änderungen der Genexpressionsmuster bei den einzelnen Patienten gefunden wurden, konnten keine signifikanten Unterschiede im Verhalten der synovialen RA-Fibroblasten zum Knorpel festgestellt werden. Die inkonstanten Änderungen des Genexpressionsmusters spiegeln sich in den SCID-Maus Implantaten wieder. Adenoviral medierte Nebeneffekte bezüglich des Verhaltens von RA- oder OA-Fibroblasten konnten ausgeschlossen werden, da nicht transduzierte Zellen sich genau so wie kontrolltransduzierte Zellen verhielten. Interessanterweise bewirkte eine sTNF RI Überexpression in OA-Fibroblasten eine erhöhte Knorpelinvasion und -degradation. Auch in RA-Fibroblasten war eine tendenzielle Steigerung der Knorpeldestruktion feststellbar, dieser Wert war jedoch statistisch nicht signifikant.
- B) *IL-1-Blockade mittels IL-1Ra, bzw. Überexpression von IL-10*: Die Überexpression von IL-10 resultierte in einer stark reduzierten Invasion von synovialen RA-Fibroblasten in den Knorpel, hatte jedoch keinen Effekt auf die Degradation des Knorpels. Im Gegensatz dazu inhibierte IL-1Ra-Überexpression die Degradation, nicht jedoch die Invasion der RA-Fibroblasten in den Knorpel (s. Abbildung 21).

2.2.2 Doppelter Gentransfer

- A) *Gentansfer von sTNF RI gemeinsam mit IL-10 oder IL-1Ra*: Die Kombinationen von sTNF RI mit IL-10 oder IL-1Ra erzielten keine signifikant höhere Knorpelprotektion, wie sie nach Einzelgentransfer von IL-10 oder IL-1Ra erzielt werden konnte. Bereits beim einzelnen Gentransfer von sTNF RI wurde ersichtlich, daß die Hemmung von TNF α nicht zu einer eindeutigen Veränderung des Genexpressionsmusters bei allen vier untersuchten Patienten führte. Dies steht im Gegensatz zu den Gentransferstudien mit IL-10 oder IL-1Ra (s. Tabelle 17) und spiegelt sich auch bei den Kombinationsstudien mit sTNF RI im inkonstanten Genexpressionsmuster wieder. Die Kombination von sTNF RI mit IL-

10 oder IL-1Ra spiegelte eher die protektiven Effekte von IL-10 oder IL-1Ra in den Implantaten wieder.

B) *Doppelter Gentransfer von IL-1Ra und IL-10*: Eine nahezu komplette Unterdrückung der Knorpeldestruktion verglichen mit individuellem Gentransfer der jeweiligen Proteine konnte durch diesen Ansatz erstmals erzielt werden. Die Unterschiede waren statistisch signifikant, sowohl in Bezug auf die Histologie als auch in Bezug auf die differentielle Genexpression. Auch histologisch konnte ein additiver Effekt zwischen Einzelgentransfer und doppeltem Gentransfer bezüglich der Protektion des koimplantierten humanen Knorpels dokumentiert werden (s. Tabelle 19).

2.2.3 Dreifacher Gentransfer

Dreifacher Gentransfer führte zu einer statistisch signifikanten Knorpelprotektion (Abbildung 22). Die protektiven Effekte waren jedoch weit geringer als diejenigen, die mittels doppeltem Gentransfer von IL-10 und IL-1Ra erzielt werden konnten (s. Tabelle 19).

Insgesamt führten weder einzelne Kombinationen von sTNF RI mit entweder IL-10 oder IL-1Ra noch dreifacher Gentransfer zu einer kompletten Knorpelprotektion. Die Kombination von sTNF RI mit IL-10 oder IL-1Ra spiegelte eher die protektiven Effekte von IL-10 oder IL-1Ra in den Implantaten wieder. Möglicherweise geben die geplanten Gentransferstudien von komplettem Synovium, in dem sich auch Entzündungszellen befinden, Aufschluß über die Effekte von TNF α -Inhibierung. Eventuell ist für potentielle protektive Effekte die Beteiligung weiterer Zellinteraktionen notwendig. Einen möglichen Ansatz stellt das erweiterte Versuchssystem mit Synovium in Kombination mit der lasergesteuerten Mikrodissektion dar, in dem aus dem implantierten Synovium gezielt mittels eines gepulsten Laserstrahls die Zellen im Knorpel-Zell-Übergang des Implantats isoliert und auf ihr Expressionsmuster hin analysiert werden könnten. Diese Methode wird derzeit im Labor für die RA etabliert und könnte Hinweise auf die Eigenschaften der an den Knorpel adhärierenden und invadierenden Zellen liefern, ohne von einem isolierten Zelltyp (synovialen Fibroblasten) auszugehen (Lechner et al., 2001).

3. Molekulare Grundlagen der Knorpelprotektion nach IL-10 und IL-1Ra Gentransfer

In allen Experimenten mit IL-1Ra und IL-10 Gentransfer waren mehrere Gene, die mit Aktivin und seinem funktionellen Antagonisten Follistatin assoziiert sind, differentiell exprimiert. Aktivin gehört zur „transforming growth factor β “ (TGF- β)-Superfamilie von dimeren Proteinen. Sie bestehen aus β A- und β B-Untereinheiten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Drei verschiedene Aktivine wurden bisher beschrieben und besitzen zum Teil ähnliche Eigenschaften (zur Übersicht siehe: Mathews et al., 1993; Mather, 1996; Yu et al., 1997): Die Homodimere Aktivin A (β A β A), Aktivin B (β B β B) und das Heterodimer Aktivin AB (β A β B). Kürzlich wurden auch noch β C-, β D- und β E-Ketten entdeckt. Die Aktivität der Aktivine wird durch heterodimere Rezeptorkomplexe vermittelt, die Typ I- (ARI und AR1b) und Typ II-Rezeptoren (ARII und ARIIb). Neben diesen Transmembranrezeptoren wurden lösliche aktivinbindende Proteine mit hoher Affinität zu den Aktivinen A und B gefunden, welche durch Bindung die biologischen Effekte der Aktivine antagonisieren, Inhibin A, ein Dimer aus einer β A-Untereinheit mit einer α -Untereinheit und Inhibin B, ein α - β B-Dimer.

Aktivine/Inhibine sind evolutionär sehr konserviert, weit verbreitet und in viele zelluläre Funktionen involviert. Ursprünglich wurden sie wegen ihrer Eigenschaft entdeckt, die Sekretion von Follikel-stimulierendem Hormon zu stimulieren (Ying, 1988). Es stellte sich jedoch heraus, daß sie in verschiedenste Prozesse eingreifen können, inklusive Entzündung und Akut-Phase-Reaktion (de Kretser et al., 1999), Proliferation und Zellwachstum (Danila et al., 2000), Überleben und Differenzierung von Nervenzellen (Schubert et al., 1990; Hashimoto et al., 1990), Gewebereparatur, Wundheilung und Angiogenese (Hubner et al., 1999; Ohga et al., 2000) sowie Matrix- bzw. Knorpelumbau über BMPs („bone morphogenetic proteins“), z.B. durch Inhibierung von Osteoklasten-Kathepsin-K medierter Knochenresorption (Funaba et al., 1996; Yonemori et al., 1997; Hummel et al., 1998; Kaneko et al., 2000; Miyazono et al., 2001). Aktivin A besitzt eine Vielzahl von Funktionen in verschiedenen Geweben. Der Einfluß auf die Pathogenese entzündlicher Gelenkerkrankungen wurde bereits durch Yu et al. (1998) und Gribi et al. (2001) vermutet. Die Autoren zeigten eine signifikante Erhöhung von Aktivin A in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten im Vergleich zu OA. Die Expression von Aktivin wird vermutlich durch

proinflammatorische Zytokine induziert, da die Aktivin-A-Produktion durch Synovialzellen und Chondrozyten in Kultur durch IL-1, TGF- β , Interferon- γ und IL-8 hochreguliert werden konnte (Yu et al., 1998). Aktivin A besitzt das Potential, die lokale Wirkung von IL-6 und IL-1 zu antagonisieren und diese selbst herunter zu regulieren. Im Gegensatz dazu induziert IL-1 die Hochregulierung von Aktivin A; *in vitro*-Studien wiesen stimulatorische Effekte von Aktivin A auf die Expression von Kollagen Typ I-mRNA in Fibroblasten nach (Sugiyama et al., 1998).

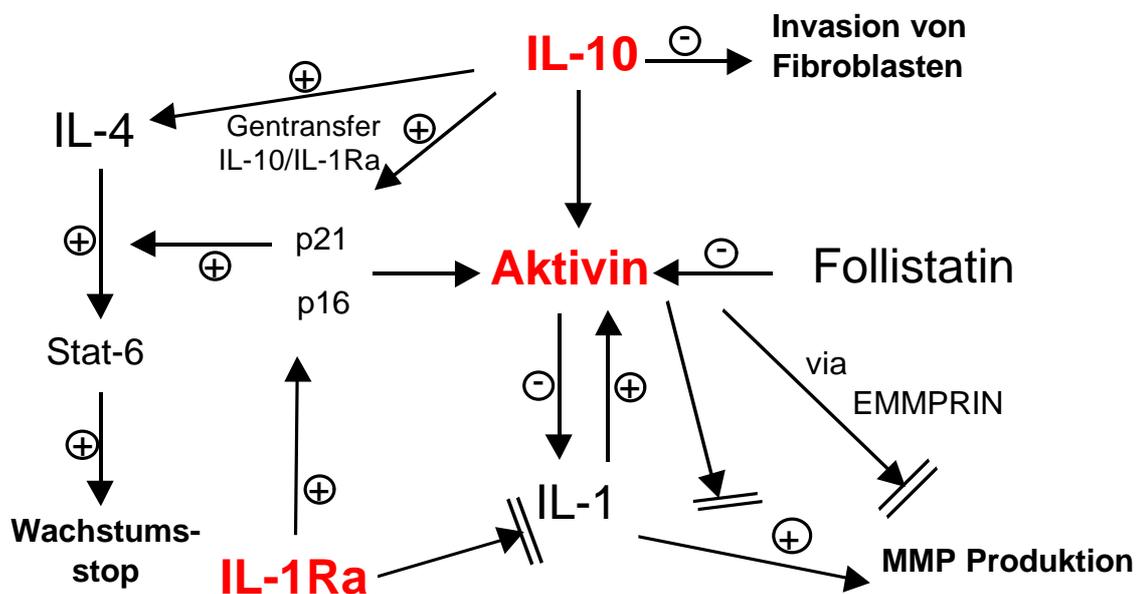
Möglicherweise ist die Menge an Aktivin in der Synovialflüssigkeit und im Synovium nicht ausreichend, um den Knorpel vor Degradation zu schützen. In unseren Experimenten konnte gezeigt werden, daß assoziierte Moleküle und Effektoren von Aktivin nicht nur eine veränderte Expression nach IL-1Ra- und IL-10-Gentransfer aufwiesen, sondern daß diese Veränderungen auch eine molekulare Basis für das Verständnis der Knorpelprotektion darstellen. In den ersten beiden Tagen nach IL-10- und IL-1Ra-Gentransfer konnte eine erhöhte Produktion von Aktivin gemessen werden, anschließend wurde Aktivin herunterreguliert. Dieser Effekt wird vermutlich durch die zusätzliche Herunterregulierung von IL-1 und anderen proinflammatorischen Zytokinen bedingt, u.a. vermittelt durch IL-1Ra (s. Abbildung 23).

Tumor-Supressor Gene wie p16INK4 waren ebenfalls zunächst nach doppeltem Gentransfer heraufreguliert. Auch dieser Effekt hielt bis zu 6 Tage nach Transduktion an und sank anschließend auf den Ausgangswert bzw. darunter. Kultivierte synoviale RA-Fibroblasten exprimieren Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren (CDK-Inhibitoren) wie p16INK4a und p21Cip1, wenn sie *in vitro* wachstumshemmt sind (Nonomura et al., 2001). Intraartikuläre p16INK4a Gentherapie resultierte in einer Verbesserung der adjuvanten Arthritis in Ratten. *In vivo* inhibierte ein adenoviraler Gentransfer von p16INK4a die Knorpeldestruktion im Tiermodell und wird als neues potentiell Agens für die Behandlung der RA angesehen (Taniguchi et al., 1999; Nasu et al., 2000). Die knorpelprotektive Aktivität steigert vermutlich über p21Cip1 die antiinflammatorischen Effekte von IL-4 und IL-10, sowie den dadurch vermittelten Wachstums- und Proliferationsstop (Zauberman et al., 1997; Wang et al., 1999; Müller-Ladner et al., 2000; Li et al., 2001; s. Abbildung 23). Neben p16INK4 war auch p33ING1, ein potentiell Tumor-Supressor-Gen, welches zelluläres Wachstum in

mehreren Geweben kontrolliert (Garkavtsev et al., 1998), gleichermaßen nach doppeltem Gentransfer in synovialen RA-Fibroblasten differentiell exprimiert.

Interessanterweise wurden auch IL-4-Vorläufer und die IL-4-Rezeptor α Untereinheit-Vorläufer hochreguliert. IL-4 ist wie IL-10 in der Lage, Entzündung und Knorpelerosionen bei der RA zu unterdrücken (van Roon et al., 2001). Der IL-4-vermittelte Wachstumsstop (Müller-Ladner et al., 2000) und der IL-10 vermittelte Proliferationsstop involvieren ebenfalls p21CIP1 (Liu et al., 2000; O'Farrell et al., 2000), was auf einen zusätzlichen Effektormechanismus von IL-10 und IL-1Ra Doppelgentransfer hindeutet (s. Abbildung 23). Darüber hinaus war „follistatin related protein“ (FRP), welches ähnliche Aminosäuresequenzen enthält wie Follistatin und nicht nur in Bezug auf Zellwachstum, sondern auch als Autoantigen bei der RA diskutiert wird (Tanaka et al., 1998), nach doppeltem Gentransfer herunterreguliert.

Abbildung 23: Schema der potentiellen molekularen Zusammenhänge nach Gentransfer von IL-10 und IL-1Ra



Im Gegensatz dazu sind Gene, die in MMP-Aktivierung und Knorpel- und Knochenumbau involviert sind, herunterreguliert, speziell „extracellular MMP inducer“ (EMMPRIN), welches die Freisetzung von MMP durch Fibroblasten vermittelt und tumorigenes Potential besitzt (Zucker et al., 2001). Diese Effekte deuten insgesamt auf Knorpelprotektion und antiinflammatorische Effekte des doppelten Gentransfers *in vivo* hin. Eine Synopsis der durch IL-1Ra und IL-10 Gentransfer erzielten Effekte bzw. deren molekularer Zusammenhänge zeigt Abbildung 23.

Insgesamt ermöglicht viraler Gentransfer zur Expression von gelenkprotektiven Genprodukten in synovialen RA-Fibroblasten die Analyse der entscheidenden Zelltypen in Bezug auf Knorpel- und Knochendestruktion und bietet sich auch - unter Verwendung eines möglichst gering immunogenen Virus - möglicherweise zur Verwendung für zukünftige klinische Gentherapie-Studien an (Pap et al., 1999).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung gentherapeutischer Ansätze für die RA. Hierzu sollten geeignete Methoden zur Analyse der differentiellen Genexpression, zum effektiven Gentransfer und zur Untersuchung von knorpelprotektiven Effekten des Gentransfers etabliert werden. Die molekularen Effekte der TNF α - und IL-1-Hemmung bzw. der IL-10 Überexpression und potentielle knorpelprotektive Effekte des Gentransfers sollten anschließend analysiert werden.

Folgende Ergebnisse konnten hinsichtlich der Fragestellungen erzielt werden:

1.) Etablierung der Methoden:

Im Verlauf der Versuchsetablierung konnte gezeigt werden, daß synoviale Fibroblasten maximal über 3-5 Passagen kultiviert werden können, ohne Veränderungen aufzuweisen. Daher war die Menge der zur Verfügung stehenden RNA stark limitiert. Um dennoch die Genexpression mehrerer Gene analysieren zu können, wurde eine Kombination von cDNA-Array und RAP-PCR etabliert, wodurch bereits mit 50 ng gesamt-RNA reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich der Bestimmung der spezifischen Genexpression erzielt werden konnten.

Zunächst wurde mit der neuen Methode die differentielle Genexpression von RA- im Vergleich zu OA-Fibroblasten untersucht. Insgesamt waren nur ca. 6 % der analysierten Gene differentiell exprimiert, wobei Gene, die Proliferation und Differenzierung induzieren, hochreguliert und Gene von proliferationshemmenden Molekülen herunterreguliert waren. Gene, die in Apoptose, Adhäsion an Knorpel/Knochen und Reparaturprozesse involviert sind, waren ebenfalls differentiell exprimiert. Als Besonderheit zeigte sich, daß *CD82*, ein Gen, welches viele interessante Verbindungen zur Pathophysiologie der RA aufweist, unter anderem Zellaggregation, Migration und T-Zell-Aktivierung, hochreguliert.

Eine stabile Genexpression konnte sowohl mit adenoviralen als auch retroviralen Vektoren über den gesamten Versuchszeitraum erzielt werden. Viral vermittelte Nebeneffekte konnten mittels parallel durchgeführter Kontrolltransduzierung mit *EGFP* und/oder *LacZ* ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurden Stimulierungen mit

äquivalenten Proteinkonzentrationen und Überstandtransfer-Experimente mit denselben Fibroblastenpopulationen durchgeführt, um ebenfalls viral vermittelte Nebeneffekte auf molekularer Ebene auszuschließen.

Zur Analyse potentiell knorpelprotektiver Effekte nach Gentransfer wurde das SCID-Maus-Modell der RA in unserem Labor für die Versuche modifiziert. Durch die Einführung der „inverse wrap“-Technik konnte eine höhere Anzahl an Implantaten pro Maus verwendet werden, auch der Nachweis der kontinuierlichen Genexpression über den gesamten Versuchszeitraum im Serum der Maus gelang durch die gesteigerte Implantatgröße.

2.) Analyse der molekularen Veränderungen nach Gentransfer:

Synoviale RA-Fibroblasten wurden hierzu viral in verschiedenen Kombinationen mit IL-10, IL-1Ra und sTNF RI transduziert und die molekularen Effekte mittels der neu etablierten Kombination von RAP-PCR und cDNA-Array analysiert:

TNF α -Hemmung:

2-6 % der analysierten Gene waren jeweils nach TNF α -Blockade in den untersuchten Fibroblastenpopulationen differentiell exprimiert, es konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen des Genexpressionsmusters in allen analysierten Fibroblastenpopulationen detektiert werden. Dies galt sowohl für TNF α -Hemmung alleine als auch für Kombination mit IL-10 und/oder IL-1Ra.

IL-10 und IL-1Ra Überexpression:

Der doppelte Gentransfer von IL-10 und IL-1Ra führte zur Hochregulierung von Tumor-Suppressor-Genen, welche in Proliferation und Wachstumshemmung involviert sind. Gene, die an Matrixregulation, Freisetzung von Matrix-abbauenden Enzymen und antiinflammatorischen Zytokinen beteiligt sind, waren ebenfalls in ihrer Expression signifikant verändert. Als völlig neue Erkenntnis für die Pathophysiologie der RA zeigte sich, daß mehrere Gene, welche mit dem pluripotenten Molekül Aktivin assoziiert sind, ebenfalls nach doppeltem Gentransfer deutlich differentiell exprimiert waren. Aktivin greift in viele Prozesse, inklusive Entzündung, Proliferation,

Gewebereparatur, Wundheilung und Matrixumbau ein und ist somit von speziellem Interesse in Bezug auf die RA.

3.) Analyse potentieller Knorpelprotektion nach Gentransfer *in vivo*:

Die TNF α -Inhibierung wies keinerlei protektive Effekte bezüglich der Knorpeldestruktion auf. IL-10 bzw. IL-1Ra alleine hemmten jeweils verschiedene Aspekte (Destruktion bzw. Invasion) der Knorpeldestruktion, konnten als Einzelgentransfer die Knorpelerosion jedoch nicht komplett unterdrücken. Interessanterweise spiegelten die Kombinationen von sTNF RI mit IL-10 oder IL-1Ra tendentiell die protektiven Aspekte von IL-10- bzw. IL-1Ra Einzelgentransfer wieder. Im Gegensatz hierzu konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, daß der doppelte Gentransfer von IL-10 und IL-1Ra in einer statistisch signifikanten, nahezu kompletten Supprimierung der Knorpeldegradation resultiert. Auf histologischer Ebene konnte zusätzlich ein additiver Effekt zwischen Einzelgentransfer und doppeltem Gentransfer bezüglich der Protektion des koimplantierten humanen Knorpels erzielt werden. Interessanterweise resultierte eine Dreifach-Transduktion von IL-10, IL-1Ra und sTNF RI zwar in einer statistisch signifikanten knorpelprotektiven Wirkung, dies war jedoch deutlich weniger effektiv als der doppelte Gentransfer von IL-10 und IL-1Ra. Insgesamt erwies sich somit die Kombination von IL-10 und IL-1Ra als effektivste bezüglich der erzielten Knorpelprotektion. Diese protektiven Effekte spiegelten sich ebenfalls in den molekularen Veränderungen nach doppeltem Gentransfer wieder.

In Zusammenschau aller Ergebnisse dieser Arbeit kann daher festgehalten werden, daß die Kombination von hochsensitiven molekularbiologischen Analysemethoden mit einem krankheitsrelevanten Tiermodell nicht nur die exakte Darstellung der molekularen und histologischen Effekte nach viralem Gentransfer ermöglicht, die Resultate der Experimente zeigen auch, daß mit einer Kombinationsgenterapie mit zwei inhibitorischen Molekülen, in unserem Ansatz IL-1Ra und IL-10, die Gelenkdestruktion bei der rheumatoiden Arthritis fast vollständig unterdrückt werden kann.

VII. ABKÜRZUNGEN

Ak	Antikörper
AMV	„avian myeloblastosis virus“
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	„bovine serum albumin“ (Rinder Serum Albumin)
cm	Zentimeter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	„Desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	„epidermal growth factor“
ELISA	„enzyme-linked-immunosorbent-assay“
EMMPRIN	„extracellular matrix metalloproteinase inducer“
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß
FCS	„fetal calf serum“ (fötales Kälberserum)
FGF	„fibroblast growth factor“
g	Gramm
GM-CSF	„granulocyte macrophage colony stimulating factor“
h	Stunde(n) („hours“)
H ₂ O _{bidest}	Zweifach destilliertes Wasser
ICAM	„intercellular adhesion molecule“
IGF	„insulin-like growth factor“
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
kg	Kilogramm
M-CSF	„macrophage colony stimulating factor“
MHC	„major histocompatibility complex“
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
MMLV	„Moloney murine leukemia virus“

MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOI	„multiplicity of infection“
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer
OA	Osteoarthritis
PBMC	„peripheral blood monocytic cells“
PBS	„Phosphate buffered salt solution“ (phosphatgepufferte Salzlösung)
PDGF	„platelet derived growth factor“
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase Kettenreaktion)
RA	Rheumatoide Arthritis
RAP-PCR	„RNA arbitrarily primed PCR“
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure („messenger-RNA“)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SCID-Maus	„severe combined immunodeficient“ Maus
SD	Standardabweichung
SDS	„sodium dodecyl sulfate“ (Natriumdodecylsulfat)
sek	Sekunde(n)
SSCP	„single strand conformation polymorphism“
sTNF RI	löslicher („soluble“) Tumor-Nekrose Faktor Rezeptor I
T _{ann}	Primerbindungs-Temperatur („annealing“)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	„transforming growth factor“
TIMP	„tissue inhibitor of metalloproteinases“
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose Faktor Rezeptor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜK	Übernachtskultur
upm	Umdrehungen pro Minute
VCAM-1	„vascular cell adhesion molecule-1„
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
ZKF	Zellkultur-Flaschen

VIII. REFERENZEN

- Aaronson,S.A., Rubin,J.S., Finch,P.W., Wong,J., Marchese,C., Falco,J. et al.: Growth factor-regulated pathways in epithelial cell proliferation. *Am Rev Respir Dis* 1990. 142, S7-10.
- Ahmad,S., Singh,N., and Glazer,R.I.: Role of AKT1 in 17beta-estradiol- and insulin-like growth factor I (IGF-I)-dependent proliferation and prevention of apoptosis in MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 1999. 58, 425-430.
- Aicher,W.K., Heer,A.H., Trabandt,A., Bridges,S.L., Jr., Schroeder,H.W., Jr., Stransky,G. et al.: Overexpression of zinc-finger transcription factor Z-225/Egr-1 in synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol* 1994. 152, 5940-5948.
- Allen,J.B., Manthey,C.L., Hand,A.R., Ohura,K., Ellingsworth,L., and Wahl,S.M.: Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1990. 171, 231-247.
- Altschul,S.F., Madden,T.L., Schaffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W. et al.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997. 25, 3389-3402.
- Alvaro-Gracia,J.M., Zvaifler,N.J., Brown,C.B., Kaushansky,K., and Firestein,G.S.: Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the synovial cells involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1991. 146, 3365-3371.
- Arend,W.P.: Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 1993. 54, 167-227.
- Arend,W.P. and Dayer,J.M.: Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995. 38, 151-160.
- Arend,W.P., Malyak,M., Smith,M.F., Jr., Whisenand,T.D., Slack,J.L., Sims,J.E. et al.: Binding of IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids. *J Immunol* 1994. 153, 4766-4774.
- Arnett,F.C., Edworthy,S.M., Bloch,D.A., McShane,D.J., Fries,J.F., Cooper,N.S. et al.: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988. 31, 315-324.
- Baldin,V., Cans,C., Superti-Furga,G., and Ducommun,B.: Alternative splicing of the human CDC25B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control? *Oncogene* 1997. 14, 2485-2495.
- Baragi,V.M.: Technology evaluation: MFG-IRAP, University of Pittsburgh. *Curr Opin Mol Ther* 2000. 2, 216-220.
- Bhatia,P., Taylor,W.R., Greenberg,A.H., and Wright,J.A.: Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S- ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal Biochem* 1994. 216, 223-226.
- Birkedal-Hansen,H.: Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995. 7, 728-735.

- Birkedal-Hansen,H., Moore,W.G., Bodden,M.K., Windsor,L.J., Birkedal-Hansen,B., DeCarlo,A. et al.: Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993. 4, 197-250.
- Boll,W., Fujisawa,J., Niemi,J., and Weissmann,C.: A new approach to high sensitivity differential hybridization. *Gene* 1986. 50, 41-53.
- Bresnihan,B.: The safety and efficacy of interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2001. 30, 17-20.
- Bucala,R., Ritchlin,C., Winchester,R., and Cerami,A.: Constitutive production of inflammatory and mitogenic cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts. *J Exp Med* 1991. 173, 569-574.
- Burmester,G.R., StuhlMüller,B., Keyszer,G., and Kinne,R.W.: Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum* 1997. 40, 5-18.
- Campion,G.V., Lebsack,M.E., Lookabaugh,J., Gordon,G., and Catalano,M.: Dose-range and dose-frequency study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. The IL-1Ra Arthritis Study Group. *Arthritis Rheum* 1996. 39, 1092-1101.
- Castor,C.W., Ritchie,J.C., Scott,M.E., and Whitney,S.L.: Connective tissue activation. XI. Stimulation of glycosaminoglycan and DNA formation by a platelet factor. *Arthritis Rheum* 1977. 20, 859-868.
- Chabaud,M., Durand,J.M., Buchs,N., Fossiez,F., Page,G., Frappart,L. et al.: Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1999. 42, 963-970.
- Charles,P., Elliott,M.J., Davis,D., Potter,A., Kalden,J.R., Antoni,C. et al.: Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF- α therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1999. 163, 1521-1528.
- Chu,C.Q., Field,M., Feldmann,M., and Maini,R.N.: Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991. 34, 1125-1132.
- Cocolakis,E., Lemay,S., Ali,S., and Lebrun,J.J.: The p38 MAPK Pathway Is Required for Cell Growth Inhibition of Human Breast Cancer Cells in Response to Activin. *J Biol Chem* 2001. 276, 18430-18436.
- Cope,A.P., Aderka,D., Doherty,M., Engelmann,H., Gibbons,D., Jones,A.C. et al.: Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1992. 35, 1160-1169.
- Crofford,L.J., Tan,B., McCarthy,C.J., and Hla,T.: Involvement of nuclear factor kappa B in the regulation of cyclooxygenase-2 expression by interleukin-1 in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum* 1997. 40, 226-236.
- Danila,D.C., Inder,W.J., Zhang,X., Alexander,J.M., Swearingen,B., Hedley-Whyte,E.T. et al.: Activin effects on neoplastic proliferation of human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2000. 85, 1009-1015.
- Danos,O. and Mulligan,R.C.: Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988. 85, 6460-6464.

- de Kretser,D.M., Hedger,M.P., and Phillips,D.J.: Activin A and follistatin: their role in the acute phase reaction and inflammation. *J Endocrinol* 1999. 161, 195-198.
- de Waal,M.R., Haanen,J., Spits,H., Roncarolo,M.G., van de Velde A., Figdor,C. et al.: Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991. 174, 915-924.
- Denijn,M., De Weger,R.A., Berends,M.J., Compier-Spies,P.I., Jansz,H., Van Unnik,J.A. et al.: Detection of calcitonin-encoding mRNA by radioactive and non-radioactive in situ hybridization: improved colorimetric detection and cellular localization of mRNA in thyroid sections. *J Histochem Cytochem* 1990. 38, 351-358.
- Diatchenko,L., Lau,Y.F., Campbell,A.P., Chenchik,A., Moqadam,F., Huang,B. et al.: Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. 93, 6025-6030.
- Dimri,G.P. and Campisi,J.: Altered profile of transcription factor-binding activities in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1994. 212, 132-140.
- Dingle,J.T.: Heberden oration 1978. Recent studies on the control of joint damage: the contribution of the Strangeways Research Laboratory. *Ann Rheum Dis* 1979. 38, 201-214.
- Dooley,S., Herlitzka,I., Hanselmann,R., Ermis,A., Henn,W., Remberger,K. et al.: Constitutive expression of c-fos and c-jun, overexpression of ets-2, and reduced expression of metastasis suppressor gene nm23-H1 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996. 55, 298-304.
- Edwards J.C.W.: Structure of synovial lining. In: Henderson B., Edwards J.C.W. (Hrsg.): *The synovial lining in health and disease*. London, Chapman and Hall 1987.
- Edwards,J.C., Wilkinson,L.S., Jones,H.M., Soothill,P., Henderson,K.J., Worrall,J.G. et al.: The formation of human synovial joint cavities: a possible role for hyaluronan and CD44 in altered interzone cohesion. *J Anat* 1994. 185, 355-367.
- El Gabalawy,H., Canvin,J., Ma,G.M., Van,d., V, Hoffman,P., Gallatin,M. et al.: Synovial distribution of alpha d/CD18, a novel leukointegrin. Comparison with other integrins and their ligands. *Arthritis Rheum* 1996. 39, 1913-1921.
- Elliott,M.J., Maini,R.N., Feldmann,M., Kalden,J.R., Antoni,C., Smolen,J.S. et al.: Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994. 344, 1105-1110.
- Elliott,M.J., Maini,R.N., Feldmann,M., Long-Fox,A., Charles,P., Katsikis,P. et al.: Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 1993. 36, 1681-1690.
- Evans,C.H., Robbins,P.D., Ghivizzani,S.C., Herndon,J.H., Kang,R., Bahnson,A.B. et al.: Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther* 1996. 7[10], 1261-1280.

- Evans,C.H., Robbins,P.D., Ghivizzani,S.C., Herndon,J.H., Wasko,M.C., Tomaino,M.M. et al.: Transfer and intra-articular expression of the IL-1Ra cDNA in human rheumatoid joints. *Arthritis Res* 2001. 3, P33.
- Farahat,M.N., Yanni,G., Poston,R., and Panayi,G.S.: Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1993. 52, 870-875.
- Fassbender,H.G.: Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Coll Relat Res* 1983. 3, 141-155.
- Firestein,G.S.: Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 1996. 39, 1781-1790.
- Firestein,G.S.: Rheumatoid synovitis and pannus. *Rheumatology* (ed by Klippel JH & Dieppe PA) 1998. 5.13.1-5.13.24, Mosby, London.
- Firestein,G.S., Alvaro-Gracia,J.M., Maki,R., and Alvaro-Garcia,J.M.: Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1990a. 144, 3347-3353.
- Firestein,G.S., Echeverri,F., Yeo,M., Zvaifler,N.J., and Green,D.R.: Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997. 94, 10895-10900.
- Firestein,G.S., Nguyen,K., Aupperle,K.R., Yeo,M., Boyle,D.L., and Zvaifler,N.J.: Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 1996. 149, 2143-2151.
- Firestein,G.S. and Paine,M.M.: Stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases gene expression in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 1992. 140, 1309-1314.
- Firestein,G.S., Paine,M.M., and Littman,B.H.: Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases, complement, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. Quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids. *Arthritis Rheum* 1991. 34, 1094-1105.
- Firestein,G.S. and Zvaifler,N.J.: How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum* 1990b. 33, 768-773.
- Franz,J.K., Kolb,S.A., Hummel,K.M., Lahrtz,F., Neidhart,M., Aicher,W.K. et al.: Interleukin-16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4+ T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 1998. 28, 2661-2671.
- Franz,J.K., Pap,T., Hummel,K.M., Nawrath,M., Aicher,W.K., Shigeyama,Y. et al.: Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000. 43, 599-607.
- Fujii,M., Sassone-Corsi,P., and Verma,I.M.: c-fos promoter trans-activation by the tax1 protein of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988. 85, 8526-8530.
- Fujisawa,K., Aono,H., Hasunuma,T., Yamamoto,K., Mita,S., and Nishioka,K.: Activation of transcription factor NF-kappa B in human synovial cells in response to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 1996. 39, 197-203.
- Funaba,M., Ogawa,K., Murata,T., Fujimura,H., Murata,E., Abe,M. et al.: Follistatin and activin in bone: expression and localization during endochondral bone development. *Endocrinology* 1996. 137, 4250-4259.

- Gabay, C., Marinova-Mutafchieva, L., Williams, R.O., Gigley, J.P., Butler, D.M., Feldmann, M. et al.: Increased production of intracellular interleukin-1 receptor antagonist type I in the synovium of mice with collagen-induced arthritis: a possible role in the resolution of arthritis. *Arthritis Rheum* 2001. 44, 451-462.
- Garkavtsev, I., Grigorian, I.A., Ossovskaya, V.S., Chernov, M.V., Chumakov, P.M., and Gudkov, A.V.: The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature* 1998. 391, 295-298.
- Garrett, S.H., Sens, M.A., Shukla, D., Nestor, S., Somji, S., Todd, J.H. et al.: Metallothionein isoform 3 expression in the human prostate and cancer- derived cell lines. *Prostate* 1999. 41, 196-202.
- Gay, S. and Gay, R.E.: Cellular basis and oncogene expression of rheumatoid joint destruction. *Rheumatol Int* 1989. 9, 105-113.
- Gay, S., Gay, R.E., and Koopman, W.J.: Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis* 1993. 52 Suppl 1, S39-S47.
- Geiler, T., Kriegsmann, J., Keyszer, G.M., Gay, R.E., and Gay, S.: A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartilage into SCID mice. *Arthritis Rheum* 1994. 37 1664-1671.
- Giaid, A., Hamid, Q., Adams, C., Springall, D.R., Terenghi, G., and Polak, J.M.: Non-isotopic RNA probes. Comparison between different labels and detection systems. *Histochemistry* 1989. 93[2], 191-196.
- Gimond, C., van Der Flier A., van Delft, S., Brakebusch, C., Kuikman, I., Collard, J.G. et al.: Induction of cell scattering by expression of beta1 integrins in beta1- deficient epithelial cells requires activation of members of the rho family of GTPases and downregulation of cadherin and catenin function. *J Cell Biol* 1999. 147, 1325-1340.
- Go, N.F., Castle, B.E., Barrett, R., Kastelein, R., Dang, W., Mosmann, T.R. et al.: Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med* 1990. 172, 1625-1631.
- Graabaek, P.M.: Ultrastructural evidence for two distinct types of synoviocytes in rat synovial membrane. *J Ultrastruct Res* 1982. 78, 321-339.
- Gracie, J.A., Forsey, R.J., Chan, W.L., Gilmour, A., Leung, B.P., Greer, M.R. et al.: A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1999. 104, 1393-1401.
- Gribi, R., Tanaka, T., Harper-Summers, R., and Yu, J.: Expression of activin A in inflammatory arthropathies. *Mol Cell Endocrinol* 2001. 180, 163-167.
- Gulko, P.S., Seki, T., and Winchester, R.: The role of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. 2000. 1, 113-135.
- Hachicha, M., Rathanaswami, P., Schall, T.J., and McColl, S.R.: Production of monocyte chemotactic protein-1 in human type B synoviocytes. Synergistic effect of tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma. *Arthritis Rheum* 1993. 36, 26-34.
- Hakkert, B.C., Kuijpers, T.W., Leeuwenberg, J.F., van Mourik, J.A., and Roos, D.: Neutrophil and monocyte adherence to and migration across monolayers of

- cytokine-activated endothelial cells: the contribution of CD18, ELAM-1, and VLA-4. *Blood* 1991. 78, 2721-2726.
- Hale,L.P., Martin,M.E., McCollum,D.E., Nunley,J.A., Springer,T.A., Singer,K.H. et al.: Immunohistologic analysis of the distribution of cell adhesion molecules within the inflammatory synovial microenvironment. *Arthritis Rheum* 1989. 32, 22-30.
- Harada,S., Yamamura,M., Okamoto,H., Morita,Y., Kawashima,M., Aita,T. et al.: Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999. 42, 1508-1516.
- Harris,E.D.: Structure and composition of joints. 1997. 1, 3-17.
- Hashimoto,M., Kondo,S., Sakurai,T., Etoh,Y., Shibai,H., and Muramatsu,M.: Activin/EDF as an inhibitor of neural differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1990. 173, 193-200.
- Hashiramoto,A., Sano,H., Maekawa,T., Kawahito,Y., Kimura,S., Kusaka,Y. et al.: C-myc antisense oligodeoxynucleotides can induce apoptosis and down- regulate Fas expression in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum* 1999. 42, 954-962.
- Hirth,A., Distler,J., Seibl,R., Müller-Ladner,U., Michel,B.A., Gay,R.E. et al.: Interleukin 21 receptor is expressed in synovial lining cells of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001. 44(Supplement), 668.
- Hubner,G., Alzheimer,C., and Werner,S.: Activin: a novel player in tissue repair processes. *Histol Histopathol* 1999. 14, 295-304.
- Hummel,K.M., Petrow,P.K., Franz,J.K., Müller-Ladner,U., Aicher,W.K., Gay,R.E. et al.: Cysteine proteinase cathepsin K mRNA is expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis and is detected at sites of synovial bone destruction. *J Rheumatol* 1998. 25, 1887-1894.
- Ikeda,Y., Masuko,K., Nakai,Y., Kato,T., Hasanuma,T., Yoshino,S.I. et al.: High frequencies of identical T cell clonotypes in synovial tissues of rheumatoid arthritis patients suggest the occurrence of common antigen- driven immune responses. *Arthritis Rheum* 1996. 39, 446-453.
- Isomaki,P., Luukkainen,R., Toivanen,P., and Punnonen,J.: The presence of interleukin-13 in rheumatoid synovium and its antiinflammatory effects on synovial fluid macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996. 39, 1693-1702.
- Jais,P., Sabourin,J.C., Bombed,J., Rougier,P., Lasser,P., Duvillard,P. et al.: Absence of somatic alterations of the EB1 gene adenomatous polyposis coli-associated protein in human sporadic colorectal cancers. *Br J Cancer* 1998. 78, 1356-1360.
- Jones,A.K., al Janabi,M.A., Solanki,K., Sobnack,R., Greenwood,A., Doyle,D.V. et al.: In vivo leukocyte migration in arthritis. *Arthritis Rheum* 1991. 34, 270-275.
- Joosten,L.A., Lubberts,E., Durez,P., Helsen,M.M., Jacobs,M.J., Goldman,M. et al.: Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 1997. 40, 249-260.
- Joutel,A. and Tournier-Lasserre,E.: Notch signalling pathway and human diseases. *Semin Cell Dev Biol* 1998. 9, 619-625.

- Judex,M., Neumann,E., Fleck,M., Pap,T., Mountz,J., Gay,R.E. et al.: 'Inverse wrap' - an improved implantation technique for virus-transduced synovial fibroblasts in the SCID mouse model for rheumatoid arthritis (RA). *Mod Rheum* 2001. in press.
- Kalden,J.R.: How do the biologics fit into the current DMARD armamentarium? *J Rheumatol Suppl* 2001. 62, 27-35.
- Kaneko,H., Arakawa,T., Mano,H., Kaneda,T., Ogasawara,A., Nakagawa,M. et al.: Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone* 2000. 27, 479-486.
- Katsikis,P.D., Chu,C.Q., Brennan,F.M., Maini,R.N., and Feldmann,M.: Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1994. 179, 1517-1527.
- Katso,R.M., Manek,S., Biddolph,S., Whittaker,R., Charnock,M.F., Wells,M. et al.: Overexpression of H-Ryk in mouse fibroblasts confers transforming ability in vitro and in vivo: correlation with up-regulation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1999. 59, 2265-2270.
- Keyszer,G.M., Heer,A.H., Kriegsmann,J., Geiler,T., Keysser,C., Gay,R.E. et al.: Detection of insulin-like growth factor I and II in synovial tissue specimens of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis by in situ hybridization. *J Rheumatol* 1995. 22, 275-281.
- Kim,K.N., Watanabe,S., Ma,Y., Thornton,S., Giannini,E.H., and Hirsch,R.: Viral IL-10 and soluble TNF receptor act synergistically to inhibit collagen-induced arthritis following adenovirus-mediated gene transfer. *J Immunol* 2000. 164, 1576-1581.
- Kobayashi,T., Okamoto,K., Kobata,T., Hasumuna,T., and Nishioka,K.: Apomodulation as a novel therapeutic concept for the regulation of apoptosis in rheumatoid synoviocytes. *Curr Opin Rheumatol* 1999. 11, 188-193.
- Koch,A.E., Kunkel,S.L., Shah,M.R., Fu,R., Mazarakis,D.D., Haines,G.K. et al.: Macrophage inflammatory protein-1 beta: a C-C chemokine in osteoarthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1995. 77, 307-314.
- Komminoth,P., Merk,F.B., Leav,I., Wolfe,H.J., and Roth,J.: Comparison of 35S- and digoxigenin-labeled RNA and oligonucleotide probes for in situ hybridization. Expression of mRNA of the seminal vesicle secretion protein II and androgen receptor genes in the rat prostate. *Histochemistry* 1992. 98, 217-228.
- Konttinen,Y.T., Reitamo,S., Ranki,A., Hayry,P., Kankaanapaa,U., and Wegelius,O.: Characterization of the immunocompetent cells of rheumatoid synovium from tissue sections and eluates. *Arthritis Rheum* 1981. 24, 71-79.
- Krane,S.M., Conca,W., Stephenson,M.L., Amento,E.P., and Goldring,M.B.: Mechanisms of matrix degradation in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1990. 580, 340-354.
- Kumkumian,G.K., Lafyatis,R., Remmers,E.F., Case,J.P., Kim,S.J., and Wilder,R.L.: Platelet-derived growth factor and IL-1 interactions in rheumatoid arthritis. Regulation of synoviocyte proliferation, prostaglandin production, and collagenase transcription. *J Immunol* 1989. 143, 833-837.
- Lacraz,S., Nicod,L.P., Chicheportiche,R., Welgus,H.G., and Dayer,J.M.: IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995. 96, 2304-2310.

- Lacronique,V., Boureux,A., Monni,R., Dumon,S., Mauchauffe,M., Mayeux,P. et al.: Transforming properties of chimeric TEL-JAK proteins in Ba/F3 cells. *Blood* 2000. 95, 2076-2083.
- Lagaudriere-Gesbert,C., Le Naour,F., Lebel-Binay,S., Billard,M., Lemichez,E., Boquet,P. et al.: Functional analysis of four tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in costimulation, cell adhesion, and migration: only CD9 upregulates HB-EGF activity. *Cell Immunol* 1997. 182, 105-112.
- Lawrence,R.C., Hochberg,M.C., Kelsey,J.L., McDuffie,F.C., Medsger,T.A., Jr., Felts,W.R. et al.: Estimates of the prevalence of selected arthritic and musculoskeletal diseases in the United States. *J Rheumatol* 1989. 16, 427-441.
- Lechman,E.R., Jaffurs,D., Ghivizzani,S.C., Gambotto,A., Kovesdi,I., Mi,Z. et al.: Direct adenoviral gene transfer of viral IL-10 to rabbit knees with experimental arthritis ameliorates disease in both injected and contralateral control knees. *J Immunol* 1999. 163, 2202-2208.
- Lechner S., Müller-Ladner U., Neumann E., Dietmaier W., Welsh J., Schölmerich J., Rüschoff J., Kullmann F. Use of simplified transcriptors for the analysis of gene expression profiles in laser-microdissected cell populations. *Lab Invest* 2001.81, 1233-1242.
- Leung,B.P., McInnes,I.B., Esfandiari,E., Wei,X.Q., and Liew,F.Y.: Combined effects of IL-12 and IL-18 on the induction of collagen- induced arthritis. *J Immunol* 2000. 164, 6495-6502.
- Levy,S., Todd,S.C., and Maecker,H.T.: CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1998. 16, 89-109.
- Li,W.Q., Dehnade,F., and Zafarullah,M.: Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires Janus kinase/STAT signaling pathway. *J Immunol* 2001. 166, 3491-3498.
- Liang,P., Averboukh,L., Keyomarsi,K., Sager,R., and Pardee,A.B.: Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1992. 52, 6966-6968.
- Lipsky,P.E., van der Heijde,D.M., St Clair,E.W., Furst,D.E., Breedveld,F.C., Kalden,J.R. et al.: Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med* 2000. 343, 1594-1602.
- Lisitsyn,N., Lisitsyn,N., and Wigler,M.: Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 1993. 259, 946-951.
- Liu,J., Estes,M.L., Drazba,J.A., Liu,H., Prayson,R., Kondo,S. et al.: Anti-sense oligonucleotide of p21(waf1/cip1) prevents interleukin 4- mediated elevation of p27(kip1) in low grade astrocytoma cells. *Oncogene* 2000. 19, 661-669.
- Lotz,M. and Guerne,P.A.: Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J Biol Chem* 1991. 266, 2017-2020.
- Lu,H., Fisher,R.P., Bailey,P., and Levine,A.J.: The CDK7-cycH-p36 complex of transcription factor IIH phosphorylates p53, enhancing its sequence-specific DNA binding activity in vitro. *Mol Cell Biol* 1997. 17, 5923-5934.

- MacGregor,A., Ollier,W., Thomson,W., Jawaheer,D., and Silman,A.: HLA-DRB1*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: increased association in men, young age at onset, and disease severity. *J Rheumatol* 1995. 22, 1032-1036.
- Maciewicz,R.A., Wotton,S.F., Etherington,D.J., and Duance,V.C.: Susceptibility of the cartilage collagens types II, IX and XI to degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B and L. *FEBS Lett* 1990. 269, 189-193.
- MacNeil,I.A., Suda,T., Moore,K.W., Mosmann,T.R., and Zlotnik,A.: IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *J Immunol* 1990. 145, 4167-4173.
- Maier,R., Ganu,V., and Lotz,M.: Interleukin-11, an inducible cytokine in human articular chondrocytes and synoviocytes, stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Biol Chem* 1993. 268, 21527-21532.
- Maini,R.N., Elliott,M., Brennan,F.M., Williams,R.O., and Feldmann,M.: Targeting TNF alpha for the therapy of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1994b. 12 Suppl 11, S63-S66.
- Maini,R.N., Elliott,M.J., Charles,P.J., and Feldmann,M.: Immunological intervention reveals reciprocal roles for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immunopathol* 1994a. 16, 327-336.
- Makarov,S.S., Olsen,J.C., Johnston,W.N., Anderle,S.K., Brown,R.R., Baldwin,A.S., Jr. et al.: Suppression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin 1 receptor antagonist cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. 93, 402-406.
- Mangasser-Stephan,K., Dooley,S., Welter,C., Mutschler,W., and Hanselmann,R.G.: Identification of human semaphorin E gene expression in rheumatoid synovial cells by mRNA differential display. *Biochem Biophys Res Commun* 1997. 234, 153-156.
- Mather,J.P.: Follistatins and alpha 2-macroglobulin are soluble binding proteins for inhibin and activin. *Horm Res* 1996. 45, 207-210.
- Mathews,L.S. and Vale,W.W.: Molecular and functional characterization of activin receptors. *Receptor* 1993. 3, 173-181.
- Mathieu-Daude,F., Cheng,R., Welsh,J., and McClelland,M.: Screening of differentially amplified cDNA products from RNA arbitrarily primed PCR fingerprints using single strand conformation polymorphism (SSCP) gels. *Nucleic Acids Res* 1996. 24, 1504-1507.
- Matsumoto,S., Müller-Ladner,U., Gay,R.E., Nishioka,K., and Gay,S.: Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Rheumatol* 1996. 23, 1345-1352.
- McClelland,M. and Welsh,J.: RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *PCR Methods Appl* 1994. 4, S66-S81.
- McInnes,I.B., al Mughales,J., Field,M., Leung,B.P., Huang,F.P., Dixon,R. et al.: The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1996. 2, 175-182.

- Meijer,C.J., Graaff-Reitsma,C.B., Lafeber,G.J., and Cats,A.: In situ localization of lymphocyte subsets in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis with monoclonal antibodies. *J Rheumatol* 1982. 9, 359-365.
- Miagkov,A.V., Kovalenko,D.V., Brown,C.E., Didsbury,J.R., Cogswell,J.P., Stimpson,S.A. et al.: NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. 95, 13859-13864.
- Middleton,J., Arnott,N., Walsh,S., and Beresford,J.: Osteoblasts and osteoclasts in adult human osteophyte tissue express the mRNAs for insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor. *Bone* 1995. 16, 287-293.
- Miossec,P., Naviliat,M., Dupuy,d.A., Sany,J., and Banchereau,J.: Low levels of interleukin-4 and high levels of transforming growth factor beta in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 1990. 33, 1180-1187.
- Miyazono,K., Kusanagi,K., and Inoue,H.: Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* 2001. 187, 265-276.
- Mohr,W., Beneke,G., and Mohing,W.: Proliferation of synovial lining cells and fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 1975. 34, 219-224.
- Moldovan,F., Pelletier,J.P., Hambor,J., Cloutier,J.M., and Martel-Pelletier,J.: Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum* 1997. 40, 1653-1661.
- Moore,K.W., Vieira,P., Fiorentino,D.F., Trounstein,M.L., Khan,T.A., and Mosmann,T.R.: Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein- Barr virus gene BCRFI. *Science* 1990. 248, 1230-1234.
- Morales-Ducret,J., Wayner,E., Elices,M.J., Alvaro-Gracia,J.M., Zvaifler,N.J., and Firestein,G.S.: Alpha 4/beta 1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol* 1992. 149, 1424-1431.
- Moreland,L.W., Baumgartner,S.W., Schiff,M.H., Tindall,E.A., Fleischmann,R.M., Weaver,A.L. et al.: Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med* 1997. 337, 141-147.
- Moreland,L.W., Margolies,G., Heck,L.W., Jr., Saway,A., Blosch,C., Hanna,R. et al.: Recombinant soluble tumor necrosis factor receptor (p80) fusion protein: toxicity and dose finding trial in refractory rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996. 23, 1849-1855.
- Morita,Y., Kashihara,N., Yamamura,M., Okamoto,H., Harada,S., Kawashima,M. et al.: Antisense oligonucleotides targeting c-fos mRNA inhibit rheumatoid synovial fibroblast proliferation. *Ann Rheum Dis* 1998. 57, 122-124.
- Muegge,K. and Durum,S.K.: From cell code to gene code: cytokines and transcription factors. *New Biol* 1989. 1, 239-246.
- Müller-Ladner,U., Elices,M.J., Kriegsmann,J.B., Strahl,D., Gay,R.E., Firestein,G.S. et al.: Alternatively spliced CS-1 fibronectin isoform and its receptor VLA-4 in rheumatoid arthritis synovium. *J Rheumatol* 1997a. 24, 1873-1880.

- Müller-Ladner,U., Evans,C.H., Franklin,B.N., Roberts,C.R., Gay,R.E., Robbins,P.D. et al.: Gene transfer of cytokine inhibitors into human synovial fibroblasts in the SCID mouse model. *Arthritis Rheum* 1999. 42, 490-497.
- Müller-Ladner,U., Gay,R.E., and Gay,S.: Molecular biology of cartilage and bone destruction. *Curr Opin Rheumatol* 1998. 10, 212-219.
- Müller-Ladner,U., Judex,M., Ballhorn,W., Kullmann,F., Distler,O., Schlottmann,K. et al.: Activation of the IL-4 STAT pathway in rheumatoid synovium. *J Immunol* 2000. 164, 3894-3901.
- Müller-Ladner,U., Kriegsmann,J., Franklin,B.N., Matsumoto,S., Geiler,T., Gay,R.E. et al.: Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* 1996. 149, 1607-1615.
- Müller-Ladner,U., Kriegsmann,J., Gay,R.E., and Gay,S.: Oncogenes in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1995. 21, 675-690.
- Müller-Ladner,U., Roberts,C.R., Franklin,B.N., Gay,R.E., Robbins,P.D., Evans,C.H. et al.: Human IL-1Ra gene transfer into human synovial fibroblasts is chondroprotective. *J Immunol* 1997b. 158, 3492-3498.
- Nakajima,T., Aono,H., Hasunuma,T., Yamamoto,K., Shirai,T., Hirohata,K. et al.: Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum* 1995. 38, 485-491.
- Nakashima,M., Eguchi,K., Aoyagi,T., Yamashita,I., Ida,H., Sakai,M. et al.: Expression of basic fibroblast growth factor in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis: detection by immunohistological staining and in situ hybridisation. *Ann Rheum Dis* 1994. 53, 45-50.
- Nasu,K., Kohsaka,H., Nonomura,Y., Terada,Y., Ito,H., Hirokawa,K. et al.: Adenoviral transfer of cyclin-dependent kinase inhibitor genes suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 2000. 165, 7246-7252.
- Nonomura,Y., Kohsaka,H., Nasu,K., Terada,Y., Ikeda,M., and Miyasaka,N.: Suppression of arthritis by forced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Cip1) gene into the joints. *Int Immunol* 2001. 13, 723-731.
- O'Donnell,K., Harkes,I.C., Dougherty,L., and Wicks,I.P.: Expression of receptor tyrosine kinase Axl and its ligand Gas6 in rheumatoid arthritis: evidence for a novel endothelial cell survival pathway. *Am J Pathol* 1999. 154, 1171-1180.
- O'Farrell,A.M., Parry,D.A., Zindy,F., Roussel,M.F., Lees,E., Moore,K.W. et al.: Stat3-dependent induction of p19INK4D by IL-10 contributes to inhibition of macrophage proliferation. *J Immunol* 2000. 164, 4607-4615.
- Oh,J.J., Grosshans,D.R., Wong,S.G., and Slamon,D.J.: Identification of differentially expressed genes associated with HER-2/neu overexpression in human breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 1999. 27, 4008-4017.
- Ohga,E., Matsuse,T., Teramoto,S., and Ouchi,Y.: Activin receptors are expressed on human lung fibroblast and activin A facilitates fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Life Sci* 2000. 66, 1603-1613.
- Ollier,W.E. and MacGregor,A.: Genetic epidemiology of rheumatoid disease. *Br Med Bull* 1995. 51, 267-285.

- Paleolog,E.M.: Angiogenesis: a critical process in the pathogenesis of RA--a role for VEGF? *Br J Rheumatol* 1996. 35, 917-919.
- Pap,T., Franz,J.K., Hummel,K.M., Jeisy,E., Gay,R., and Gay,S.: Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of Expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction. *Arthritis Res* 2000. 2, 59-64.
- Pap,T., Müller-Ladner,U., Gay,R., and Gay,S.: Gene therapy in rheumatoid arthritis: how to target joint destruction? *Arthritis Res* 1999. 1, 5-9.
- Probert,L., Plows,D., Kontogeorgos,G., and Kollias,G.: The type I interleukin-1 receptor acts in series with tumor necrosis factor (TNF) to induce arthritis in TNF-transgenic mice. *Eur J Immunol* 1995. 25, 1794-1797.
- Pui,J.C., Allman,D., Xu,L., DeRocco,S., Karnell,F.G., Bakkour,S. et al.: Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 1999. 11, 299-308.
- Purrello,M., Di Pietro,C., Viola,A., Rapisarda,A., Stevens,S., Guermah,M. et al.: Genomics and transcription analysis of human TFIID. *Oncogene* 1998. 16, 1633-1638.
- Rathanaswami,P., Hachicha,M., Sadick,M., Schall,T.J., and McColl,S.R.: Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1993. 268, 5834-5839.
- Reuterdaahl,C., Tingstrom,A., Terracio,L., Funa,K., Heldin,C.H., and Rubin,K.: Characterization of platelet-derived growth factor beta-receptor expressing cells in the vasculature of human rheumatoid synovium. *Lab Invest* 1991. 64, 321-329.
- Rinaldi,N., Schwarz-Eywill,M., Weis,D., Leppelmann-Jansen,P., Lukoschek,M., Keilholz,U. et al.: Increased expression of integrins on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis in vitro correlates with enhanced binding to extracellular matrix proteins. *Ann Rheum Dis* 1997. 56, 45-51.
- Roux-Lombard,P., Eberhardt,K., Saxne,T., Dayer,J.M., and Wollheim,F.A.: Cytokines, metalloproteinases, their inhibitors and cartilage oligomeric matrix protein: relationship to radiological progression and inflammation in early rheumatoid arthritis. A prospective 5-year study. *Rheumatology (Oxford)* 2001. 40, 544-551.
- Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T. et al.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988. 239, 487-491.
- Saiki,R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.B., Horn,G.T., Erlich,H.A. et al.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985. 230, 1350-1354.
- Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977. 74, 5463-5467.
- Santelli,G., Califano,D., Chiappetta,G., Vento,M.T., Bartoli,P.C., Zullo,F. et al.: Thymosin beta-10 gene overexpression is a general event in human carcinogenesis. *Am J Pathol* 1999. 155, 799-804.

- Savonet,V., Maenhaut,C., Miot,F., and Pirson,I.: Pitfalls in the use of several "housekeeping" genes as standards for quantitation of mRNA: the example of thyroid cells. *Anal Biochem* 1997. 247, 165-167.
- Saxne,T., Palladino,M.A., Jr., Heinegard,D., Talal,N., and Wollheim,F.A.: Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum* 1988. 31, 1041-1045.
- Schubert,D., Kimura,H., LaCorbiere,M., Vaughan,J., Karr,D., and Fischer,W.H.: Activin is a nerve cell survival molecule. *Nature* 1990. 344, 868-870.
- Sehgal,A., Boynton,A.L., Young,R.F., Vermeulen,S.S., Yonemura,K.S., Kohler,E.P. et al.: Application of the differential hybridization of Atlas Human expression arrays technique in the identification of differentially expressed genes in human glioblastoma multiforme tumor tissue. *J Surg Oncol* 1998. 67, 234-241.
- Seki,T., Selby,J., Haupl,T., and Winchester,R.: Use of differential subtraction method to identify genes that characterize the phenotype of cultured rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum* 1998. 41, 1356-1364.
- Selkoe,D.J.: Notch and presenilins in vertebrates and invertebrates: implications for neuronal development and degeneration. *Curr Opin Neurobiol* 2000. 10, 50-57.
- Sen,M., Lauterbach,K., El Gabalawy,H., Firestein,G.S., Corr,M., and Carson,D.A.: Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000. 97, 2791-2796.
- Serru,V., Le Naour,F., Billard,M., Azorsa,D.O., Lanza,F., Boucheix,C. et al.: Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochem J* 1999. 340, 103-111.
- Shibagaki,N., Hanada,K., Yamaguchi,S., Yamashita,H., Shimada,S., and Hamada,H.: Functional analysis of CD82 in the early phase of T cell activation: roles in cell adhesion and signal transduction. *Eur J Immunol* 1998. 28, 1125-1133.
- Shigeyama,Y., Pap,T., Kunzler,P., Simmen,B.R., Gay,R.E., and Gay,S.: Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000. 43, 2523-2530.
- Simkin,P.A.: Synovial perfusion and synovial fluid solutes. *Ann Rheum Dis* 1995. 54, 424-428.
- Song,K., Chen,Y., Goke,R., Wilmen,A., Seidel,C., Goke,A. et al.: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J Exp Med* 2000. 191, 1095-1104.
- Stastny,P.: Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1978. 298, 869-871.
- Stockwell,R.A. and Meachim,G.: The Chondrocytes. 1979. 69-145.
- Stonans,I., Stonane,E., Vogelsang,H., Junker,U., and Jager,L.: Differential expression of cytokine genes in CD27-positive and - negative CD4 lymphocyte subsets from healthy humans and rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int* 1996. 15, 249-254.

- Sugiyama,M., Ichida,T., Sato,T., Ishikawa,T., Matsuda,Y., and Asakura,H.: Expression of activin A is increased in cirrhotic and fibrotic rat livers. *Gastroenterology* 1998. 114, 550-558.
- Szekanecz,Z., Haines,G.K., Lin,T.R., Harlow,L.A., Goerdts,S., Rayan,G. et al.: Differential distribution of intercellular adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-2, and ICAM-3) and the MS-1 antigen in normal and diseased human synovia. Their possible pathogenetic and clinical significance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994. 37, 221-231.
- Tak,P.P., Smeets,T.J., Daha,M.R., Kluin,P.M., Meijers,K.A., Brand,R. et al.: Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthritis Rheum* 1997. 40, 217-225.
- Tanaka,M., Ozaki,S., Osakada,F., Mori,K., Okubo,M., and Nakao,K.: Cloning of follistatin-related protein as a novel autoantigen in systemic rheumatic diseases. *Int Immunol* 1998. 10, 1305-1314.
- Taniguchi,K., Kohsaka,H., Inoue,N., Terada,Y., Ito,H., Hirokawa,K. et al.: Induction of the p16INK4a senescence gene as a new therapeutic strategy for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1999. 5, 760-767.
- Taylor,D.J.: Cytokine combinations increase p75 tumor necrosis factor receptor binding and stimulate receptor shedding in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1994. 37, 232-235.
- Tian,Q., Taupin,J., Elledge,S., Robertson,M., and Anderson,P.: Fas-activated serine/threonine kinase (FAST) phosphorylates TIA-1 during Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* 1995. 182, 865-874.
- Trabandt,A., Aicher,W.K., Gay,R.E., Sukhatme,V.P., Fassbender,H.G., and Gay,S.: Spontaneous expression of immediately-early response genes c-fos and egr-1 in collagenase-producing rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatol Int* 1992a. 12, 53-59.
- Trabandt,A., Aicher,W.K., Gay,R.E., Sukhatme,V.P., Nilson-Hamilton,M., Hamilton,R.T. et al.: Expression of the collagenolytic and Ras-induced cysteine proteinase cathepsin L and proliferation-associated oncogenes in synovial cells of MRL/l mice and patients with rheumatoid arthritis. *Matrix* 1990. 10, 349-361.
- Trabandt,A., Gay,R.E., Fassbender,H.G., and Gay,S.: Cathepsin B in synovial cells at the site of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991. 34, 1444-1451.
- Trabandt,A., Gay,R.E., and Gay,S.: Oncogene activation in rheumatoid synovium. *APMIS* 1992b. 100, 861-875.
- Trenkle,T., Welsh,J., Jung,B., Mathieu-Daude,F., and McClelland,M.: Non-stoichiometric reduced complexity probes for cDNA arrays. *Nucleic Acids Res* 1998. 26, 3883-3891.
- Trenkle,T., Welsh,J., and McClelland,M.: Differential display probes for cDNA arrays. *Biotechniques* 1999. 27, 554-60.
- Usui,H., Ichikawa,T., Miyazaki,Y., Nagai,S., and Kumanishi,T.: Isolation of cDNA clones of the rat mRNAs expressed preferentially in the prenatal stages of brain development. *Brain Res Dev Brain Res* 1996. 97, 185-193.

- van de Loo, F.A., Joosten, L.A., van Lent, P.L.E.M., Arntz, O.J., and van den Berg, W.B.: Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1995. 38, 164-172.
- van Roon, J.A., Lafeber, F.P., and Bijlsma, J.W.: Synergistic activity of interleukin-4 and interleukin-10 in suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001. 44, 3-12.
- Vogt, T.M., Welsh, J., Stolz, W., Kullmann, F., Jung, B., Landthaler, M. et al.: RNA fingerprinting displays UVB-specific disruption of transcriptional control in human melanocytes. *Cancer Res* 1997. 57, 3554-3561.
- Wang, M., Liu, A., Garcia, F.U., Rhim, J.S., and Stearns, M.E.: Growth of HPV-18 immortalized human prostatic intraepithelial neoplasia cell lines. Influence of IL-10, follistatin, activin-A, and DHT. *Int J Oncol* 1999. 14, 1185-1195.
- Watt, I. and Cobby, M.: Treatment of rheumatoid arthritis patients with interleukin-1 receptor antagonist: radiologic assessment. *Semin Arthritis Rheum* 2001. 30, 21-25.
- Wellmann, A., Thieblemont, C., Pittaluga, S., Sakai, A., Jaffe, E.S., Siebert, P. et al.: Detection of differentially expressed genes in lymphomas using cDNA arrays: identification of clusterin as a new diagnostic marker for anaplastic large-cell lymphomas. *Blood* 2000. 96, 398-404.
- Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S., Cheng, R., Ralph, D., and McClelland, M.: Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res* 1992. 20, 4965-4970.
- Werb, Z., Mainardi, C.L., Vater, C.A., and Harris, E.D., Jr.: Endogenous activation of latent collagenase by rheumatoid synovial cells. Evidence for a role of plasminogen activator. *N Engl J Med* 1977. 296, 1017-1023.
- Westacott, C.I., Whicher, J.T., Barnes, I.C., Thompson, D., Swan, A.J., and Dieppe, P.A.: Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1990. 49, 676-681.
- Wicks, I.P., Leizer, T., Wawryk, S.O., Novotny, J.R., Hamilton, J., Vitti, G. et al.: The effect of cytokines on the expression of MHC antigens and ICAM-1 by normal and transformed synoviocytes. *Autoimmunity* 1992. 12, 13-19.
- Wilder, R.L.: Hypothesis for retroviral causation of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1994. 6, 295-299.
- Williams, R.O., Feldmann, M., and Maini, R.N.: Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen- induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992. 89, 9784-9788.
- Woods, J.M., Haines, G.K., Shah, M.R., Rayan, G., and Koch, A.E.: Low-level production of interleukin-13 in synovial fluid and tissue from patients with arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1997. 85, 210-220.
- Ying, S.Y.: Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 1988. 9, 267-293.
- Yonemori, K., Imamura, T., Ishidou, Y., Okano, T., Matsunaga, S., Yoshida, H. et al.: Bone morphogenetic protein receptors and activin receptors are highly expressed

- in ossified ligament tissues of patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *Am J Pathol* 1997. 150, 1335-1347.
- Yu,E.W., Dolter,K.E., Shao,L.E., and Yu,J.: Suppression of IL-6 biological activities by activin A and implications for inflammatory arthropathies. *Clin Exp Immunol* 1998. 112, 126-132.
- Yu,J. and Dolter,K.E.: Production of activin A and its roles in inflammation and hematopoiesis. *Cytokines Cell Mol Ther* 1997. 3, 169-177.
- Yukioka,M., Wakitani,S., Murata,N., Toda,Y., Ogawa,R., Kaneshige,T. et al.: Elderly-onset rheumatoid arthritis and its association with HLA-DRB1 alleles in Japanese. *Br J Rheumatol* 1998. 37, 98-101.
- Zauberman,A., Oren,M., and Zipori,D.: Involvement of p21(WAF1/Cip1), CDK4 and Rb in activin A mediated signaling leading to hepatoma cell growth inhibition. *Oncogene* 1997. 15, 1705-1711.
- Zhang,H.G., Su,X., Liu,D., Liu,W., Yang,P., Wang,Z. et al.: Induction of specific T cell tolerance by Fas ligand-expressing antigen- presenting cells. *J Immunol* 1999. 162, 1423-1430.
- Zucker,S., Hymowitz,M., Rollo,E.E., Mann,R., Conner,C.E., Cao,J. et al.: Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer. *Am J Pathol* 2001. 158, 1921-1928.
- Zvaifler,N.J.: A retrospective analysis of the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rev Rhum Engl Ed* 1996. 63, 791-796.
- Zvaifler,N.J. and Firestein,G.S.: Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994. 37, 783-789.
- Zvaifler,N.J., Tsai,V., Alsalameh,S., von Kempis,J., Firestein,G.S., and Lotz,M.: Pannocytes: distinctive cells found in rheumatoid arthritis articular cartilage erosions. *Am J Pathol* 1997. 150, 1125-1138.

IX. PUBLIKATIONEN

1. Publikationen

1. Lechner S., Müller-Ladner U., **Neumann E.**, Dietmaier W., Welsh J., Schölmerich J., Rüschoff J., Kullmann F. Use of simplified transcripts for the analysis of gene expression profiles in laser-microdissected cell populations. *Lab Invest* 81, 1233-1242, 2001.
2. Judex M., **Neumann E.**, Fleck M., Pap T., Mountz J.D., Gay R.E., 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* 11, 145-150, 2001.
3. **Neumann E.**, Kullmann F., Judex M., Jüsten H.P., Wessinghage D., Gay S., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Identification of differentially expressed genes in rheumatoid arthritis by a combination of cDNA array and RAP-PCR. *Arthritis Rheum*, in press.
4. **Neumann E.**, Turner I.H., Barnum S.R., Echols J., Schölmerich J., Gay S., Müller-Ladner U. Expression of human complement factors b and C3, complement receptors C3a and C5a in synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, in press.
5. **Neumann E.**, Judex M., Kullmann F., Grifka J., Robbins P.D., Pap T., Evans C.H., Gay S., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Complete inhibition of cartilage destruction by double gene transfer of IL-1Ra and IL-10 is mediated by the activin pathway. *J Clin Invest*, eingereicht.
6. Wunder A., Müller-Ladner U., Stelzer E.H.K., Funk J., **Neumann E.**, Sinn H., Pap T., Gay S., Fiehn C. Albumin-based drug-transfer as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, eingereicht.
7. **Neumann E.**, Lechner S., Grifka J., Gay S., Rüschoff J., Renke B., Schölmerich J., Kullmann F., Müller-Ladner U. Evaluation of differentially expressed genes by a combination of cDNA array and RAP-PCR using the AtlasImage™ 2.0 software. *Biotechniques*, eingereicht.
8. Lechner S., Müller-Ladner U., **Neumann E.**, Dietmar W., Welsh J., Schölmerich J., Rüschoff J., Kullmann F. Identification of differentially expressed genes along the normal colonic crypt – the basis to understand malignant transformation. *Lab Invest*, eingereicht.
9. **Neumann E.**, Kullmann F., Fleck M., Jüsten H.P., Mountz J.D., Robbins P.D., Evans C.H., Gay S., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Changes in proto-oncogene and cytokine expression in rheumatoid synovial fibroblasts after adenoviral TNF α R p55 gene transfer. *Arthritis Rheum*, in Vorbereitung.
10. **Neumann E.**, Judex M., Kullmann F., Grifka J., Gay S., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Altered gene expression in rheumatoid Arthritis synovial fibroblasts after few culture passages. *Lab Invest*, in Vorbereitung.
11. **Neumann E.**, Judex M., Kullmann F., Fleck F., Perlick L., Robbins P.D., Mountz J.D., Gay R.E., Evans C., Pap T., Gay S., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Triple

gene transfer with IL-1ra, IL-10 and sTNFR is less cartilage protective than double gene transfer with IL-1ra and IL-10. J Immunol, in Vorbereitung.

2. Vorträge und Poster

Selbst gehaltene Vorträge und vorgestellte Poster sind unterstrichen.

1. Müller-Ladner U., **Neumann E.**, Pap T., Evans C.H., Robbins P.D., Schölmerich J., Gay S. Gene transfer of cytokine inhibitors into human synovial fibroblasts in the SCID mouse model for rheumatoid arthritis. Vortrag. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Gentherapie, Ulm, 1999.
2. **Neumann E.**, Müller-Ladner U. Veränderung des Proto-Onkogen-Musters in rheumatoiden Synovialfibroblasten nach Gentransfer des TNFRI-Gens mittels Adenoviren. Vortrag. Forschungswochenende der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I der Universität Regensburg, Thonlohe, Oktober 1999.
3. Judex M., Kullmann F., **Neumann E.**, Jüsten H.P., Wessinghage D., Welsh J., Nishioka K., McClelland M., Gay S., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Poster. Virus-dependent proto-oncogene-mediated chemotaxis - a novel pathway operative in rheumatoid arthritis synovium. Arthritis Rheum 42, S247, 1999.
4. Judex M., Lechner S., **Neumann E.**, Jüsten H.P., Wessinghage D., Gay S., Firestein G.S., Schölmerich J., Kullmann F., Müller-Ladner U. Poster. Analyse des p53 Tumor Suppressor Gens in synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Z Rheumatol 58, Suppl. 1, 40, 1999.
6. Judex M., Kullmann F., Lechner S., **Neumann E.**, Jüsten H.P., Gay S., Wessinghage D., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Poster. Expression und Regulation von CENP-E in Synovium und synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Z Rheumatol 58, Suppl. 1, 42, 1999.
7. **Neumann E.**, Fleck M., Judex M., Jüsten H.P., Mountz J.D., Gay S., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Poster. Alteration of proto-oncogene and cytokine expression following adenovirus based TNFaR p55 gene transfer in rheumatoid synovial fibroblasts. Arthritis Rheum 43(9 Supplement), 2000.
8. **Neumann E.**, Judex M., Pap T., Distler O., Gay R.E., Robbins P.D., Evans C.H., Schölmerich J., Gay S., Müller-Ladner U. Vortrag. Additive cartilage protection by retrovirus-based double-gene transfer with IL-1Ra and IL-10 in the SCID mouse model for RA. Arthritis Rheum 43(9 Supplement), 2000.
9. Judex M., **Neumann E.**, Kullmann F., Wessinghage D., Jüsten H.P., Schölmerich J., Gay S., Müller-Ladner U. Poster. Combination of RAP-PCR for differential display and cDNA expression array identifies p33ING1 and CD82 genes hitherto unrelated to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 43(9 Supplement), 2000.
10. **Neumann E.**, Judex M., Kullmann F., Pap T., Robbins P.D., Evans C.H., Gay S., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Vortrag, Poster. Anti-cytokine double gene transfer in the SCID mouse model. Immunobiol 203, 483, 2000.
11. **Neumann E.**, Judex M., Kullmann F., Schölmerich J., Distler O., Gay S., Müller-Ladner U. Poster. A highly sensitive method to identify differentially expressed genes in rheumatoid synovial fibroblasts. Immunobiol 203, 483-484, 2000.

12. **Neumann E.**, Fleck M., Judex M., Kullmann F., Jüsten H.P., Mountz J.D., Wessinghage D., Gay S., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Vortrag. Alteration of proto-oncogene pattern in rheumatoid synovial fibroblasts following adenovirus-based TNFR p55 gene transfer. *Ann Rheum Dis* 59 (Supplement 1), 38, 2000.
13. Judex M., **Neumann E.**, Fleck M., Pap T., Mountz J.D., Gay R.E., Schölmerich J., Gay S., Müller-Ladner U. Poster. Improved implantation technique for virus-based gene transfer in the SCID-mouse model for RA. *Ann Rheum Dis* 59 (Supplement 1), 145, 2000.
14. Müller-Ladner U., Judex M., **Neumann E.**, Fleck M., Kullmann F., Gay R.E., Mountz J.D., Nishioka K., McClelland M., Schölmerich J., Gay S. Vortrag. Gene expression analysis reveals novel molecular mechanisms in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ryumachi* 40, 318, 2000.
15. Fleck M., **Neumann E.**, Kullmann F., Judex M., Jüsten H.P., Mountz J.D., Wessinghage D., Gay S., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Poster. Proto-Onkogen-Expression in rheumatoiden Fibroblasten nach adenoviralem TNF- α Rp55 Gentransfer. *Med Klin* 95 (Abstract-Band I), 110, 2000.
16. **Neumann E.**, Fleck M., Kullmann F., Judex M., Jüsten H.P., Mountz J.D., Wessinghage D., Gay S., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Vortrag. Auswirkung des adenoviralen TNF- α Rp55 Gentransfers auf die Proto-Onkogen-Expression in rheumatoiden Synovialfibroblasten. *Z Rheumatol* 59 (Suppl. 3), III/54, 2000.
17. **Neumann E.**, Judex M., Kullmann F., Jüsten H.P., Robbins P.D., Evans C.H., Wessinghage D., Gay S., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Poster. Viraler IL-10 oder IL-1ra Gentransfer in rheumatoide Synovialfibroblasten: Auswirkungen auf Genexpression und Aggressivität gegenüber Gelenkknorpel. *Z Rheumatol* 59 (Suppl. 3), III/55, 2000.
18. Judex M., **Neumann E.**, Kullmann F., Wessinghage D., Jüsten H.P., Schölmerich J., Gay S., Welsh J., McClelland M., Müller-Ladner U. Poster. Identifizierung differentiell exprimierter Gene bei der rheumatoiden Arthritis mittels einer Kombination aus RAP-PCR und cDNA array. *Z Rheumatol* 59 (Suppl. 3), III/31, 2000.
19. Judex M., **Neumann E.**, Fleck M., Pap T., Mountz J.D., Gay R.E., Schölmerich J., Gay S., Müller-Ladner U. Poster. Neue Implantationstechnik für virustransduzierte Zellen im SCID-Maus-Modell der rheumatoiden Arthritis (RA). *Z Rheumatol* 59 (Suppl. 3), III/38, 2000.
20. Judex M., **Neumann E.**, Laux C., Lechner S., Kullmann F., Müller-Ladner U. Vortrag. Novel genes in RA pathophysiology. Forschungswochenende der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I der Universität Regensburg, Parsberg, Oktober 2000.
21. Pap T., Müller-Ladner U., **Neumann E.**, Gabay C., Arend W.P., Mima T., Seemayer C.A., Evans C.H., Robbins P.D., Gay R.E., Gay S. Vortrag. Double gene transfer with IL-1ra and IL-10 but not with IL-1ra alone reduces cartilage degradation in the SCID mouse model of rheumatoid arthritis. *Swiss Research Program 4th Annual Meeting*, Fribourg, Oktober 2000.
22. **Neumann E.**, Judex M., Kullmann F., Fleck M., Perlick L., Robbins P.D., Mountz J.D., Gay R.E., Evans C.H., Pap T., Gay S., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Vortrag. Triple gene transfer with IL-1Ra, IL-10 and sTNFR is less cartilage

- protective than double gene transfer with IL-1Ra and IL-10. *Arthritis Rheum* 44 (9 Supplement), 2001.
23. **Neumann E.**, Judex M., Kullmann F., Anders S., Robbins P.D., Gay R.E., Pap T., Evans C.H., Schölmerich J., Gay S., Müller-Ladner U. Poster. Cartilage protection by double gene transfer with IL-1Ra and IL-10 in the SCID mouse model for rheumatoid arthritis is mediated through the activin pathway. *Arthritis Rheum* 44 (9 Supplement), 2001.
24. Judex M., **Neumann E.**, Distler O., Kullmann F., Grifka J., Gay S., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Poster. Expression of chemokine receptor CXCR4 mRNA is downregulated in prednisolone rheumatoid arthritis (RA) but not in osteoarthritis (OA) synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 44(9 Supplement), 2001.
25. **Neumann E.**, Tarner I.H., Barnum S.R., Fleck M., Kullmann F., Gay S., Schölmerich J., Müller-Ladner U. Poster. Lokale Produktion und Modulation von Komplementproteinen im rheumatoiden Synovium. *Z Rheumatol* 60, (Suppl. 1), I/54-I/55, 2001.
26. **Neumann E.**, Judex M., Grifka J., Kullmann F., Masuda K., Schölmerich J., Gay S., Müller-Ladner U. Poster. Veränderte Genexpression in synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis nach wenigen Zellkulturpassagen. *Z Rheumatol* 60, (Suppl. 1), I/55, 2001.
27. Wunder A., Fiehn C., **Neumann E.**, Sinn H., Stelzer E.H.K., Müller-Ladner U. Poster. Albumin-gekoppeltes Methotrexat (MTX-HSA): Aufnahme durch knorpelarrhodierende synoviale Fibroblasten in-vitro und in-vivo. *Z Rheumatol* 60, (Suppl. 1), I/79, 2001.
28. Müller-Ladner U., **Neumann E.**, Judex M., Kullmann F., Grifka J., Masuda K., Gay S., Schölmerich J. Poster. Altered gene expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after few culture passages. *Ann Rheum Dis* 60, Suppl. 1, 86, 2001.
29. Müller-Ladner U., Tarner I., Barnum S., Echols J., **Neumann E.**, Fleck M., Judex M., Kullmann F., Mountz J., Schölmerich J., Gay S. Poster. Local production and modulation of complement proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Ann Rheum Dis* 60, Suppl. 1, 96, 2001.
30. Seemayer C.A., Kuchen S., Neidhart M., Kuenzler P., **Neumann E.**, Pruschy M., Pap T., Aicher W.K., Müller-Ladner U., Michel B.A., Gay R.E., Gay S. Vortrag. The destructive process of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (RA-SF) is independent of p53. *Ann Rheum Dis* 60, Suppl. 1, 113, 2001.
31. Müller-Ladner U., **Neumann E.**, Lechner S., Judex M., Schölmerich J., Kullmann F., Gay S. Vortrag. Laser-mediated microdissection in combination with RAP-PCR for differential display and cDNA array as tool for gene expression analysis in rheumatoid synovium. *EULAR 1st European Workshop on Gene Expression in Arthritis*. October 2001, Book of Abstracts.
32. Müller-Ladner U., **Neumann E.**, Fleck M., Pap T., Gay R.E., Robbins P.D., Mountz J.D., Evans C.H., Schölmerich J., Gay S. Vortrag. Double and triple gene transfer in arthritis. *Arthritis Res* 3 (suppl. 1), A5, 2001.
33. Müller-Ladner U., **Neumann E.**, Judex M., Distler O., Gay R.E., Kullmann F., Robbins P.D., Pap T., Evans C.H., Gay S., Schölmerich J. Poster. Additive

-
- Hemmung der Knorpeldestruktion durch Doppelgentransfer im SCID Maus Modell der Rheumatoiden Arthritis. Med. Klin 96 (Abstract-Band I), 125, 2001.
34. Kullmann F., Lechner S., Müller-Ladner U., **Neumann E.**, Rüschoff J., Schölmerich J. Poster. Identifikation des Genexpressionsmusters innerhalb der normalen Kolonkrypte – die Basis um maligne Transformation zu verstehen. 13. AGO Winterkurs Halle, Januar 2001.
35. Lechner S., Müller-Ladner U., **Neumann E.**, Welsh J., Schölmerich J., Rüschoff J., Kullmann F. Poster. Identification of differentially expressed genes along the normal colonic crypt – the basis to understand malignant transformation. UEGW, Amsterdam, Januar 2001.

X. ANHANG

Anhang 1: Matrix Metalloproteinasen

MMP	Alternative Bezeichnung	Quellen	Substrate
MMP-1	Kollagenase-1	Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen, Chondrozyten, Osteoblasten u.a.	Kollagen Typ I, II, III, V, VII, VIII, X, Aggrekan, Gelatine, Serpine
MMP-2	Gelatinase A	Fibroblasten, Makrophagen, Blutplättchen, T-Zellen	Kollagen Typ I, IV, V, VII, X, Gelatine, Elastin, Fibronectin, Laminin
MMP-3	Stromelysin-1	Fibroblasten, Makrophagen, Chondrozyten, Endothelzellen u.a.	Kollagen Typ II, IV; IX, X, XI, Laminin, Fibronectin, Proteoglykan, Aggrekan, Elastin, Gelatine
MMP-8	Kollagenase-2	Fibroblasten, Chondrozyten, PBMC, Endothelzellen	Kollagen Typ I, II, III, V
MMP-9	Gelatinase B	Makrophagen, Osteoklasten, Neutrophile, Endothelzellen, Eosinophile, T-Zellen u.a.	Kollagen Typ IV, Gelatine, Aggrekan, Laminin
MMP-10	Stromelysin-2	Fibroblasten, Epithelzellen, Keratinozyten, T-Zellen	Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin, Proteoglykan, Gelatine
MMP-11	Stromelysin-3	Fibroblasten, Epithelzellen	Laminin, α 1-Proteinase Inhibitor
MMP-13	Kollagenase-3	Fibroblasten, entwickelndes Knochengewebe	Kollagen Typ I, II, III, IV, V, IX, X, XI, Gelatine, Laminin, Aggrekan, Fibronectin
MMP-14	MT1-MMP	Fibroblasten, Makrophagen, Epithelzellen, Osteoklasten	Kollagen Typ I, II, III, Gelatine, Laminin, Fibronectin, Aggrekan, Proteoglykan
MMP-15	MT2-MMP	Fibroblasten, Makrophagen	Kollagen Typ I, II, III, Gelatine, Fibronectin, Laminin, Aggrekan

Übersichtsartikel zu MMP: (Birkedal-Hansen et al., 1993)

Anhang 2: Zytokin-Produktion und –Funktion im RA-Synovium

Zytokin	Quelle	Wirkung	Referenz
IL-1 α/β	Makrophagen, Fibroblasten	Proinflammatorisch	(Farahat et al., 1993)
IL-2	T-Zellen	Proinflammatorisch	(Firestein et al., 1990b)
IL-3	T-Zellen	Proinflammatorisch	(Stonans et al., 1996)
IL-4	T-Zellen	Antiinflammatorisch	(Firestein et al., 1990a)
IL-6	Makrophagen, Fibroblasten, T-Zellen	Proinflammatorisch MMP-Regulation	(Lotz et al., 1991; Farahat et al., 1993)
IL-7	Fibroblasten	Entzündung (pro???)	(Harada et al., 1999)
IL-8	Makrophagen, Fibroblasten	Chemotaxis	(Rathanaswami et al., 1993)
IL-10	Makrophagen, Fibroblasten, T-Zellen	Antiinflammatorisch	(Katsikis et al., 1994)
IL-11	Makrophagen, Fibroblasten	MMP-Regulation, antiinflammatorisch	(Maier et al., 1993)
IL-12	Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen, Dendritische Zellen		(Leung et al., 2000)
IL-13	T-Zellen, Fibroblasten	Antiinflammatorisch	(Woods et al., 1997)
IL-15	Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen	Chemotaxis, proinflammatorisch	(McInnes et al., 1996)
IL-16	Fibroblasten, T-Zellen	Chemotaxis, Proinflammatorisch	(Franz et al., 1998)
IL-17	T-Zellen	Proinflammatorisch	(Chabaud et al., 1999)
IL-18	Makrophagen, Fibroblasten	Antiinflammatorisch	(Gracie et al., 1999)
IL-21	Fibroblasten	Proinflammatorisch	(Hirth et al., 2001)
Interferon- γ	T-Zellen	Proinflammatorisch	(Firestein et al., 1990a)
TGF	Makrophagen, Monozyten	Kollagensynthese, Proliferation, pro- /antiinflammatorisch	(Allen et al., 1990)
TNF- α/β	Makrophagen, Fibroblasten, T-Zellen	Proinflammatorisch	(Farahat et al., 1993)
SDF-1	Fibroblasten	Chemotaxis	(Seki et al., 1998)
RANTES	Fibroblasten	Chemotaxis	(Rathanaswami et al., 1993)
MCP-1	Fibroblasten, Makrophagen	Chemotaxis	(Hachicha et al., 1993)
MIP-1 α/β	Fibroblasten, Makrophagen	Chemotaxis	(Koch et al., 1995)

Bedanken möchte ich mich bei...

- ... Herrn PD Dr. Ulf Müller-Ladner für die Themenvergabe, für zahlreiche Anregungen und die freundschaftliche Unterstützung, dafür daß er mich immer wieder motivierte und für seine Hilfe beim Schreiben von Publikationen, Anträgen und dieser Arbeit (irgendwie haben wir immer jede „Deadline“ einhalten können). Besonders bedanken möchte ich mich für die Ermöglichung der Teilnahme an zahlreichen Fortbildungen und Tagungen.
- ... Frau Prof. Dr. Susanne Modrow für ihre Anregungen und ihre Bereitschaft diese Doktorarbeit zu betreuen.
- ... Herrn Prof. Dr. Jürgen Schölmerich für die Bereitstellung der Labors und für die vielen Rehearsals von diversen Vorträgen und Postern, sowie für die Korrekturen der Publikationen.
- ... Herrn Prof. Dr. Joachim Grifka für die gute Zusammenarbeit bei der Gewinnung der Gewebeproben in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie.
- ... Renate und Steffen Gay für den fortwährenden wissenschaftlichen Dialog und die jederzeit bereitstehende Unterstützung und Kooperation.
- ... Martin Judex, der mich mit seiner Diskussionsbereitschaft und Kritik angetrieben hat und für seine enthusiastische Organisation von Tagungsreisen (was mir wirklich fehlen wird - ich wünsche Dir in Deinem nächsten Labor einen eigenen Rechner ganz für Dich allein) und Sandra Lechner für ihre Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft, das viele Korrekturlesen und für den Wettlauf zur rechtzeitigen Abgabe, da ich so immer angespornt war, ihren Vorsprung einzuholen.
- ... allen Mitarbeitern der Med I und den Mitgliedern der „Arbeitsgruppe A8“, insbesondere Birgit Riepl ohne deren kompetente, selbstständige Mitarbeit ich noch lange nicht so weit wäre, Wibke Ballhorn für ihre intensive Mitarbeit, sowie Andre Hess und natürlich allen A8-lern für die außerinstitutionellen Aktivitäten, die für das freundschaftliche Miteinander im Labor außerordentlich förderlich waren.
- ... meinen Eltern für die vielseitige und liebevolle Unterstützung, meinem Bruder Erhard v.a. für unterhaltsame E-Mails und Arne (meinen „Hansl“) .