

Entwicklung muriner cDNA-Arrays zur Bestimmung der  
Proteinase-Expression arthritischer Fibroblasten im  
Modell der Antigen-induzierten Arthritis

**Dissertation**  
**zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae  
(Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät**  
**der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von  
Nadine Stopfel  
geboren am 24. Dezember 1976  
in Bad Salzungen

Dekan: Prof. Dr. K. Benndorf

Gutachter:

1. Prof. Dr. B. Wiederanders, Jena
2. Prof. Dr. R. Bräuer, Jena
3. Prof. Dr. Chr. Sommerhoff, München

Datum der öffentlichen Verteidigung: 18. März 2008

## Inhaltsverzeichnis

### I Abkürzungsverzeichnis

### II Zusammenfassung

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Proteinasen und ihre Funktion	1
1.2	Proteinase-cDNA-Arrays	2
1.3	Die Rheumatoide Arthritis (RA)	5
1.3.1	Proteinasen und Inhibitoren in der Rheumatoiden Arthritis	6
1.4	Die Antigen-induzierte Arthritis (AIA)	9
1.5	Zielstellung der Arbeit	10
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1	Material	11
2.1.1	Geräte	11
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	11
2.1.3	Chemikalien & biologische Stoffe	12
2.1.4	Kit-Systeme	13
2.1.5	Enzyme	14
2.1.6	Kulturmedien	14
2.1.7	Puffer & Lösungen	15
2.2	Methoden	17
2.2.1	Herstellung der cDNA-Arrays	17
2.2.2	Einsatz der cDNA-Arrays im Modell der Antigen-induzierten Arthritis	23
2.2.2.1	Modell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA)	23
2.2.2.2	Präparation der Kniegelenke für direkte RNA-Isolation	23
2.2.2.3	Isolation der RNA direkt ( <i>in vivo</i> ) aus Kniegelenken	23
2.2.2.4	Präparation der Kniegelenke für Kultivierung von Synoviozyten	26

---

2.2.2.5	Isolation der RNA aus kultivierten Synoviozyten	26
2.2.2.6	Hybridisierung der cDNA-Arrays	27
2.2.3	Validierung der cDNA-Array-Ergebnisse durch Real Time PCR	31
2.2.3.1	DNase-Verdau und Reverse Transkription	31
2.2.3.2	Real Time PCR	32
2.2.4	Beurteilung der Arthritis	34
2.2.4.1	Histologie	34
2.2.4.2	Immunhistochemie	36
2.2.5	Statistik	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1	cDNA-Array-Entwicklung	38
3.2	cDNA-Array-Analysen	42
3.2.1	cDNA-Array-Analysen von direkt ( <i>in vivo</i> ) isolierter RNA	42
3.2.2	cDNA-Array-Analysen von RNA aus kultivierten Synoviozyten	59
3.3	Real Time PCR-Analysen	64
3.3.1	Real Time PCR-Analysen von direkt ( <i>in vivo</i> ) isolierter RNA	65
3.3.2	Real Time PCR-Analysen von RNA aus kultivierten Synoviozyten	78
3.4	Histologie	84
3.5	Immunhistochemie von MMP-3	87
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>90</b>
4.1	Kritik des experimentellen Design	91
4.2	Beurteilung der Ergebnisse der <i>in vivo</i> -Untersuchungen	95
4.2.1	Matrixmetalloproteinasen <i>in vivo</i>	96
4.2.2	Kathepsine <i>in vivo</i>	98
4.2.3	Inhibitoren <i>in vivo</i>	100
4.3	Beurteilung der Ergebnisse der Untersuchungen für kultivierte Synoviozyten	101
4.3.1	Matrixmetalloproteinasen in kultivierten Synoviozyten	102
4.3.2	Kathepsine in kultivierten Synoviozyten	103
4.3.3	Inhibitoren in kultivierten Synoviozyten	104
4.4	Beurteilung der Histologie	104
4.5	Beurteilung der Immunhistochemie für MMP-3	104

---

4.6	Schlußfolgerungen	106
4.7	Ausblick	107
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>108</b>

**Ehrenwörtliche Erklärung**

**Lebenslauf**

**Danksagung**

---

**I Abkürzungsverzeichnis**

AA	Adjuvans-induzierte Arthritis (engl. <i>adjuvant-induced arthritis</i> )
Ag	Antigen
AIA	Antigen-induzierte Arthritis (engl. <i>antigen-induced arthritis</i> )
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumine</i> )
CD	Differenzierungscluster (engl. <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i> )
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans (engl. <i>complete Freund's adjuvant</i> )
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis (engl. <i>collagen-induced arthritis</i> )
COX-II	Cyclooxygenase Typ II
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetan-3,2'(5'-Chloro)tricyclo[3.3.1.1.1]decan-4-yl)phenyl-phosphat
DIG-11-dUTP	Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridin-5'-triphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP's	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
ECM	Extrazellulärer Raum (engl. <i>extracellular matrix</i> )
Eco RI	Escherichia coli RY 13 I
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i> )
FLS	Synoviozyten (engl. <i>fibroblast like synoviocytes</i> )
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hind III	Haemophilus influenza (Serotyp d)
HLA	humanes Leukozytenantigen (engl. <i>human leucocyte antigen</i> )
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K I	Kollagen Typ I
K II	Kollagen Typ II

---

kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
mBSA	methyliertes Rinderserumalbumin (engl. <i>methylated bovine serum albumine</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MT-MMP	membrane type of Matrixmetalloproteinases
MW	Mittelwert
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PIA	Pristan-induzierte Arthritis (engl. <i>pristan-induced arthritis</i> )
PG	Proteoglykan
PGIA	Proteoglykan-induzierte Arthritis (engl. <i>proteoglycan-induced arthritis</i> )
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt (engl. <i>severe combined immunodeficiency</i> )
SCWIA	Streptokokken-Zellwand-induzierte Arthritis (engl. <i>streptococcal cell wall-induced arthritis</i> )
SEM	Standardfehler (engl. <i>standard error of mean</i> )
SF	Synviale Fibroblasten
SPA	engl. <i>single primer amplification</i>
TIMP	Tissue inhibitor of Matrixmetalloproteinases
TNF	Tumornekrosefaktor
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
ZIA	Zymosan-induzierte Arthritis (engl. <i>zymosan-induced arthritis</i> )
-/-	Knock-out

---

## II Zusammenfassung

**Einleitung:** Die rheumatoide Arthritis ist eine chronische Autoimmunerkrankung, die unter anderem durch eine Dysregulation von Proteinasen und Proteinase-Inhibitoren zum vermehrten Abbau von Matrixproteinen im Gelenkknorpel führt. Daraus resultiert die Zerstörung und der damit verbundene Funktionsverlust der betroffenen Gelenke. Der Identifikation der beteiligten Proteinase und Inhibitoren sowie ihrer Triggerung gilt bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze besonderes Augenmerk.

**Aufgabenstellung:** Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines cDNA-Array mit murinen Proteinase-Sequenzen. Dieser Array sollte im Maus-Modell der Antigen-Induzierten Arthritis (AIA) eingesetzt werden, um Veränderungen des Expressionsprofils beteiligter Proteinase auf mRNA-Ebene bei dieser Erkrankung zu erfassen. Um die Zuverlässigkeit der cDNA-Arrays zu überprüfen, sollten die gewonnenen Ergebnisse mittels Real Time PCR überprüft werden.

**Methoden:** Zur Gewinnung der cDNA für die Herstellung der Arrays wurde die Gesamt-RNA aus Organen von weiblichen Mäusen (Balb/C), murinen Embryonen (C57BL/6) und den murinen Zelllinien NIH 3T3 und BaF3 gewonnen, durch vorab designte Primer mittels einer reversen Transkription umgeschrieben und durch PCR amplifiziert. Anschließend wurde die cDNA auf eine Nylonmembran gespottet. Zur Anwendung der cDNA-Arrays wurde mRNA aus Kniegelenken weiblicher Mäuse (C57BL/6) vor und 3, bzw. 14 Tage nach dem Auslösen der AIA isoliert und aufbereitet. Ebenso wurde die mRNA aus Zellkulturen von Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (FLS) vor und 7 Tage nach Auslösen der AIA einer Analyse mittels cDNA-Arrays unterzogen. Dazu wurden während der reversen Transkription durch den Einbau von DIG-11-dUTP die Sonden hergestellt, welche anschließend mit den Arrays hybridisiert wurden. Nach mehreren Waschschritten wurden die Membranen mit einem Lumineszenz-Kit entwickelt, die Signale auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht und anschließend quantifiziert. Einige Ergebnisse wurden durch Real Time PCR verifiziert. Mittels Immunhistochemie wurde versucht MMP-3 einer definierten Zellpopulation zuzuordnen. Des Weiteren erfolgte noch eine allgemeine Beurteilung der Arthritis anhand des Arthritiscores auf von HE- und Safranin-O-gefärbten histologischen Schnittpräparaten.

**Ergebnisse:** Die Untersuchung der mRNA aus Kniegelenken zeigte auf den cDNA-Arrays eine Zunahme der Signalstärken von MMP-3 und TIMP-1 am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Dieses Ergebnis konnte mit der Methode der Real Time PCR bestätigt werden. Die

---



Untersuchung der mRNA aus Zellkulturen von FLS zeigte ebenfalls eine Zunahme der Signalstärke von MMP-3 nach Auslösen der AIA, was auch durch Real Time PCR verifiziert werden konnte. Bei allen übrigen untersuchten Proteinasen zeigte sich keine oder nur eine tendenzielle Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden. Die für MMP-3 durchgeführte Immunhistochemie zeigte eine deutliche Färbung von Chondrozyten.

**Diskussion:** Die Untersuchung zeigte, dass die entwickelten Arrays zwar hybridisierbar waren, allerdings mit geringer Validität. Nur für MMP-3 und TIMP-1 konnte eine deutliche Zunahme der Signalstärke in der akuten Phase der AIA nachgewiesen und durch Real Time PCR bestätigt werden. Folgende Fehlerquellen konnten dafür identifiziert werden. Die Qualität der Expressionsdaten hängt wesentlich von der Spezifität der Hybridisierung ab. Es wurde lediglich versucht, mögliche Kreuzhybridisierungen durch einen Abgleich der Primer mit der Datenbank Blast-search ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) auszuschließen. Spätere Untersuchungen zeigten, dass dies nicht ausreicht. Des weiteren ist es von Bedeutung, zu welchem Zeitpunkt die Probe markiert wird. Als günstig hat sich in späteren nicht mehr von mir selbst durchgeführten Versuchen die Markierung während der linearen Amplifikation unter Verwendung eines SPA-Primers (entspricht einer Sequenz des T7 Promoters) nach reverser Transkription von Gesamt-RNA erwiesen. Selbst einfache Schritte wie homogenes Aufbringen der Hybridisierungslösung, Vermeiden von Austrocknungen und Einhalten von konstanten Temperaturen erwiesen sich als Fehlerquellen, die den Hybridisierungsprozess verfälschen können. Mit der Entwicklung des ArrayTube<sup>®</sup> (AT), die zum Teil auf Erfahrungen dieser Arbeit aufbaute, wurden diese Probleme gelöst (Schüler et al., 2006).

## 1 Einleitung

### 1.1 Proteinasen und ihre Funktion

Bei einer Reihe von entzündlichen und malignen Erkrankungen sind fehlregulierte Proteinasemuster zu beobachten, auf die therapeutisch Einfluß genommen werden kann. So wird eine dysregulierte Proteinaseexpression bzw. eine Imbalance zwischen Proteinasen und ihren Inhibitoren angeschuldigt in der Karzinomentstehung und -ausbreitung sowie bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen eine entscheidende Rolle zu spielen. Voraussetzung für eine Beeinflussung dieser fehlregulierten Proteinasen ist allerdings eine genaue Analyse dieser Muster.

Proteinase sind hydrolytisch wirkende Enzyme, welche sich durch ein ubiquitäres bis hochspezifisches Vorkommen auszeichnen. Sie sind an zahlreichen intra- und extrazellulären Prozessen wie zum Beispiel der Aktivierung von Proteinen, der Abspaltung von Signalpeptiden intrazellulär synthetisierter Proteine oder der Prozessierung von Antigenen beteiligt. Nach der Zuordnung zur Enzymhauptklasse der Hydrolasen (EC 3) können sie in zwei weitere Klassen unterteilt werden. Exopeptidasen hydrolysieren Peptidbindungen vom C- oder N-terminalen Ende. Endopeptidasen, welche auch Proteinase genannt werden, hydrolysieren Peptidbindungen im Inneren eines Substrates.

Meist wird eine unspezifische vollständige Proteolyse von Endopeptidasen im lysosomalen Kompartiment oder im Proteasom eingeleitet und von Exopeptidasen mit dem weiteren Abbau des Polypeptids zu Dipeptiden und Aminosäuren fortgeführt. Manche Proteinase wie zum Beispiel Kathepsin B und H weisen neben Endopeptidaseaktivität auch Carboxy- und Aminopeptidaseaktivität auf. Die Nomenklatur definiert die verschiedenen Proteinase weiterhin nach dem katalytischen Mechanismus oder der Form des aktiven Zentrums. Man unterscheidet Serin-, Cystein-, Aspartat-, Threonin- und Metalloproteinase nach dem charakteristischen Aminosäurerest bzw. Metallkomplex im katalytischen Zentrum und Peptidasen mit unbekanntem katalytischen Mechanismus (Barrett & Rawlings, 1991). Serin- und Metalloproteinase sind meist im Zytosol und im Extrazellularraum lokalisiert, während bestimmte Cystein- und Aspartatproteinase hauptsächlich dem lysosomalen Kompartiment zugeordnet werden können (Uchiyama et al., 1994). Innerhalb einer Enzymklasse werden die Enzyme nochmals in Familien unterteilt. So können fast alle Kathepsine den Cysteinproteinase der Papainfamilie zugeordnet werden. Solche Enzymgruppen sind in ihrem evolutionären Ursprung verwandt und weisen somit eine relativ hohe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz auf.

Im weiteren Sinn können die Proteinase auch funktional nach ihrem Vorkommen eingeteilt

werden. So werden einige Enzyme ubiquitär exprimiert, andere sind durch ein gewebespezifisches Expressionsmuster verbunden mit einer spezifischen Funktion gekennzeichnet (Wang et al., 1998). Kathepsin K wird zum Beispiel in Osteoklasten exprimiert und beteiligt sich dort an der Knochenresorption. Ein Kathepsin K-Defizit in den Osteoklasten äußert sich im Krankheitsbild der Pyknodysostosis (Bromme et al., 1996; Gelb et al., 1996; Motyckova & Fisher, 2002). Ein weiteres Beispiel für eine gewebespezifische Proteinase stellt Kathepsin S dar, welche primär im lymphatischen Gewebe exprimiert wird und dort die Degradation der invarianten Kette des MHC-Klasse-II-Komplexes katalysiert (Riese et al., 1996).

Die extrazelluläre Proteolyse wird durch den pH-Wert und natürliche Inhibitoren reguliert (Kirschke et al., 1995). Eine Dysregulation durch Veränderung dieser Balance führt zu unkontrollierter Proteolyse, was z. B. bei Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, der Tumorinvasion und Metastasierung zur Gewebedestruktion entscheidend beiträgt (Sloane et al., 1984; Mignatti & Rifkin, 1993).

## 1.2 Proteinase-cDNA-Arrays

Die Erforschung des kompletten menschlichen Genoms und die Identifizierung des ganzen Spektrums an exprimierten Genen ermöglichte die Entwicklung einer neuen Methode zur simultanen Analyse einer Vielzahl von Genen auf Transkriptionsniveau. Mit der Mikroarray-Technologie erhofft man sich Verständnis für pathophysiologische Prozesse auf molekularer Ebene, welches bisher durch die limitierte Anzahl von bekannten Genen und der Schwierigkeit eine große Anzahl von Genen gleichzeitig zu untersuchen, begrenzt wurde (Grant et al., 2002). Genexpression ist ein hochkomplexer und streng regulierter Prozess der einer Zelle erlaubt, auf Umwelteinflüsse als auch auf ihre eigenen Bedürfnisse zu reagieren.

Arrays benutzt man um biologisches Material wie z. B. Nukleinsäuren, Peptide oder Proteine in hoher Dichte aufzutragen und zu binden. Arrays beinhalten oder bestehen aus einer festen Trägersubstanz, die es erlaubt, große Mengen an Proben in geregelten Abständen aufzubringen, so dass diese für parallele Experimente genutzt werden können (Sültmann et al., 2005). Die Methode der cDNA-Mikroarray-Technologie ermöglicht es, anhand der Hybridisierung von Nukleinsäuren (Watson-Crick-Base-Pairing) verschiedene zu vergleichende Gewebe nicht nur bezüglich des Expressionsmusters zu untersuchen.

Es stehen verschiedene cDNA-Array-Verfahren zur Verfügung. Sie unterscheiden sich prinzipiell in der Konstruktion des cDNA-Arrays selbst und in der Hybridisierungstechnik, die genutzt wird, um die Proben zu untersuchen.

Bei Filter-Arrays werden mit PCR amplifizierte cDNA-Sequenzen mittels einer speziellen Dot-

Blot-Anlage unter Vakuum auf einen Filter aufgetragen. Die cDNA, die zur Herstellung eines Arrays benötigt wird, kann durch RNA-Isolation aus Zellen oder Geweben und anschließender reverser Transkription (RT) gewonnen werden. Ein Muster von verschiedenen cDNA Sequenzen kann dann auf mehrere Filter gespottet werden, die nun zur Analyse von verschiedenen Proben zur Erstellung eines Expressionsprofils genutzt werden können. Aus Zellen oder Geweben isolierte RNA-Proben, die einer Untersuchung auf Filter-Arrays zugeführt werden sollen, werden radioaktiv oder Fluoreszenz markiert und unter Verwendung eines Phosphorimagers ausgewertet. Um Unterschiede in der Expression zwischen verschiedenen Proben untersuchen zu können, werden die einzelnen Filter separat hybridisiert, und anschließend werden die Signalstärken der verschiedenen DNA-Positionen miteinander verglichen.

Bei einer weiteren Methode der Array-Technologie werden verschiedene cDNA-Sequenzen auf Glasobjektträger aufgebracht. Bei diesem Verfahren können zwei miteinander zu vergleichende Proben, die mit verschiedenen fluoreszenten Farbstoffen markierte sind, auf einem Objektträger gleichzeitig untersucht werden. Die Fluoreszenzsignale der beiden Proben werden mit einem konfokalen Mikroskop gemessen und anschließend mit einer speziellen Software miteinander verglichen. Wird den zu untersuchenden Proben eine Referenzprobe beigefügt, können verschiedene zu unterschiedlichen Zeitpunkten hybridisierte Arrays miteinander verglichen werden.

**Tab. 1: Vergleich der verschiedenen Arrayformate.** modifiziert nach Clontech Laboratories, Inc. • [www.clontech.com](http://www.clontech.com)

Material	Glas	Plastik	Nylon
<b>Anzahl der Gene/ Array</b>	3800	12000	1200
<b>Markierungs-/ Detektionsmethode</b>	<sup>33</sup> P/ Fluoreszenz	<sup>33</sup> P	<sup>32</sup> P/ <sup>33</sup> P/ Chemilumineszenz
<b>Relative Sensitivität</b>	+++ / ++	+++	++++ / +++ / +++
<b>Relative Auflösung</b>	+++ / ++++	+++	+ / ++ / +
<b>Imaging Equipment</b>	Phosphorimager/ Fluoreszenzscanner	Phosphorimager	Phosphorimager od. Autoradiogramm
<b>Strippen für mehrfachen Gebrauch</b>	nein	ja	ja
<b>Analyse/ Schwierigkeit der Anwendung</b>	leichte Anwendung, keine Objektträger- deformation	leichte Anwendung, keine Membran- deformation	komplizierte Anwendung
<b>Homologe Gendiskriminierung</b>	++++	++++	++
<b>Kalibrierungsstandards für Vergleiche</b>	nein	ja	nein

Als dritte und wohl bekannteste Methode stehen Oligonukleotid-Chips, z. B. der Firma Affymetrix zur Verfügung. Bei diesem Verfahren werden Oligonukleotide mit einer Länge von 20 - 30 Nukleotiden in situ auf einen Chip synthetisiert, wobei die dabei verwendete photolithographische Technologie eine extrem dichte Anordnung von bis zu 64 000 Oligonukleotiden auf wenigen Quadratcentimetern ermöglicht. Diese Arrays können zu den gleichen Experimenten wie Filter- und Glasträgerarrays herangezogen werden, allerdings hat diese Methode eine geringere Spezifität als die erstgenannten Methoden, was sich in der Länge der Sequenzen begründet. Der Vorteil dieser Methode ist allerdings die hohe Anzahl an Genen, die auf einem einzigen Chip analysiert werden können. Die Spezifität wird bei diesen Arrays dadurch erreicht, das für eine Targetsequenz bis zu 20 verschiedene Oligos gespottet werden.

Mikroarrays können entsprechend ihrem Typ in den verschiedensten Disziplinen zur Anwendung kommen. So ermöglichen DNA-Arrays anhand der vergleichenden Genomhybridisierung die Detektion von Deletionen, Insertionen und anderen Mutationen und kommen damit zur Risikoabschätzung, Prognosestellung einer Erkrankung und in der Tumorklassifikation zum Einsatz. Expressionsanalysen, denen Arrays mit immobilisierter cDNA zugrunde liegen, sind ein Hilfsmittel in der Entwicklung von Arzneimitteln oder der Prüfung von Arzneimittelwirkungen. Mittels Oligonukleotid- oder cDNA-Mikroarrays ist z. B. eine differenziertere Analyse von Erkrankungen auf individueller Ebene möglich, wenn sie mit einem verändertem Expressionsmuster einhergehen. Ihr Einsatz ist seit einiger Zeit in der Forschung etabliert. Um sie jedoch in der klinischen und molekularbiologischen Routinediagnostik einzuführen, werden umfangreiche Validierungsstudien vorausgesetzt. Trotzdem werden große Erwartungen an sie geknüpft bezüglich diagnostischen und prognostischen Aussagen, sowie zur Identifizierung von Genen, auf die therapeutisch Einfluß genommen werden kann. Desweiteren stehen noch DNA-Arrays zur Analyse von single nucleotide polymorphism (SNP) zur Verfügung, mit deren Hilfe prädiktive Vorhersagen für Auftreten bestimmter Erkrankungen oder Reaktionen auf äußere Einflüsse getroffen werden können. Auch auf Proteinebene kommt mittlerweile die Chiptechnologie zum Einsatz. Mit Antikörper- und Proteinarrays können beispielsweise serologische Bestimmungen durchgeführt werden, aber auch der Nachweis der Aktivierung intrazellulärer Signalwege ist damit schon gelungen.

Die Untersuchung von menschlichen Erkrankungen im tierexperimentellen Modell erschließt eine weitere Einsatzmöglichkeit von Arrays zur Klärung von Gemeinsamkeiten und Unterschieden und letztendlich der Übertragbarkeit und Nutzung der Ergebnisse von tierexperimentellen Untersuchungen für den Menschen.

Um Analysen auf cDNA-Arrays korrekt beurteilen zu können, muß man sich der Vor- und

Nachteile dieser Technologie bewußt sein. So sollten Experimente mit cDNA-Arrays selbstverständlich reproduzierbar sein. Die Rate der falschen Ergebnisse von cDNA-Arrays liegt ohne die Verwendung von definierten statistischen Algorithmen bei ca. 60 – 80 % (Firestein & Pisetsky, 2002). Deshalb ist zum einen eine detaillierte statistische Analyse der Resultate und zum anderen eine unabhängige Methode zur Validierung und Quantifizierung der Ergebnisse nötig (z. B. Real Time PCR). Außerdem wird im allgemeinen empfohlen, homogene Zellpopulationen zu untersuchen, um auch wirklich Schlußfolgerungen bezüglich des Expressionsprofils der untersuchten Probe ziehen zu können. Die Auswertung der enormen Datenmenge wird am besten mit bioinformatischen Methoden erreicht.

### 1.3 Die Rheumatoide Arthritis (RA)

Die rheumatoide Arthritis ist eine schubweise verlaufende chronische Autoimmunerkrankung, die durch Gelenkschmerzen, Morgensteifigkeit, Schwellung der Gelenke und im fortschreitenden Krankheitsverlauf durch Gelenkdestruktion und –deformation gekennzeichnet ist. Die betroffenen Patienten können zusätzlich von extraartikulären Manifestationen wie Vaskulitis, Entzündungen von Sehnenscheiden, Schleimbeuteln, innerer Organe und Augen beeinträchtigt werden. Die Ätiologie dieser Erkrankung ist bisher unbekannt, es werden sowohl Umwelteinflüsse als auch eine genetische Disposition verantwortlich gemacht (Silman et al., 1993). Möglicherweise führt ein exogenes Agens, wie zum Beispiel eine Virusinfektion bei Personen mit entsprechender genetischer Prädisposition zu einer massiven Entzündung und nachfolgender Gelenkdestruktion (Murai et al., 1999; Carty et al., 2004).



**Abb. 1: Klinisches Bild und Röntgenaufnahme einer Patientin mit rheumatoider Arthritis.** Darstellung der fortschreitenden Gelenkdestruktion vor allem in den Grund- und Mittelgelenken mit Schwanenhals- und Knopflochdeformität nach <http://radiologie.charite.de>

65 – 80% der Patienten sind HLA-DR4-positiv. Frauen erkranken häufiger an dieser systemisch verlaufenden Entzündung, die ihr Maximum der Ersterkrankung um das 40. Lebensjahr aufweist. Ein Merkmal im Verlauf der RA ist vorallem der Ab- und Umbau des Gelenkknorpels durch knorpelabbauende Enzyme wie zum Beispiel Kathepsine und Matrixmetalloproteinasen sowie die Bildung eines hochvaskulären Pannusgewebes, welcher nicht nur ein Hinweis für das gestörte Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose ist (Karouzakis et al., 2006). Dieser weist ein tumorähnliches Wachstum auf und besteht aus residenten Synoviozyten der aus vormals 1-3 Schichten bestehenden Deckzellschicht sowie infiltrierenden Makrophagen, welche in der Lage sind Entzündungsmediatoren zu synthetisieren und ihrerseits wiederum die Entzündung und den Knorpelabbau zu unterhalten (Gay et al., 1993; Yanni et al., 1994;). Verschiedene Zelltypen, wie beispielsweise T-Zellen, Antigen-präsentierende Zellen und endotheliale Zellen sind ebenfalls in das Pathogenesegeschehen der RA involviert.

Die bisher bekannten Therapiemaßnahmen ermöglichen zum heutigen Zeitpunkt nur ein Verzögern des Fortschreitens der Erkrankung bzw. ein Lindern der Symptome. Desweiteren haben die heute verfügbaren Medikamente meist schwere Nebenwirkungen, wie gastrointestinale oder kardiovaskuläre Affektionen. Unlängst wurde der COX-II-Inhibitor Vioxx vom Markt genommen, weil er im Verdacht steht, für eine gesteigerte Inzidenz von Herzinfarkten und Schlaganfällen verantwortlich zu sein. Das wirft auch die Entwicklung von Medikamenten mit ähnlichem Wirkungsmechanismus weit zurück, da sich die Vermutungen häufen, dass eine COX-II-Inhibition immer mit kardiovaskulären Nebenwirkungen verbunden ist. Es sollte noch erwähnt werden, dass die sonst üblicherweise verordneten NSAR trotz ihrer antiphlogistischen Wirkung keinerlei positiven Einfluß auf die Progression der Gelenkdegeneration haben (Yasuda et al., 2004). Deshalb ist es von eminenter Bedeutung, die komplexen Zusammenhänge im Krankheitsverlauf der RA zu erforschen, um so neue Therapiestrategien entwickeln zu können und die bereits vorhandenen Möglichkeiten zu verbessern und auszuschöpfen.

### 1.3.1 Proteinase und Inhibitoren in der Rheumatoiden Arthritis

Der Abbau des Gelenkknorpels und somit die Zerstörung der Gelenkoberfläche in der RA wird der vermehrten Aktivität einer Reihe von Proteinase angelastet. So wird wahrscheinlich die initiale Degradation des Kollagenetzwerkes, welches als irreversibler Schritt in der RA angesehen wird, von Matrixmetalloproteinasen eingeleitet (Mort et al., 2001).

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) gehören einer Familie von zink- und calciumabhängigen Enzymen an, deren Beteiligung am metastatischen Potential von Tumoren schon mehrfach

nachgewiesen wurde (Wojtowicz-Praga et al., 1997; Deryugina & Quigley, 2006; Wu et al., 2006). Sie brauchen einen neutralen pH-Wert und vereinen die Fähigkeit verschiedene Komponenten der ECM zu degradieren. (Murphy et al., 2002). Sie können bezüglich ihrer Domänenstruktur, zellulärer Lokalisation und Substratselektivität in 5 verschiedene Gruppen eingeteilt werden, die Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine und MT-MMP's. Einige MMP's, wie Enamelysin und Epilysin (MMP-20 und MMP-28) können keiner der Klassen zugeordnet werden, andere wiederum müssten in mehreren Kategorien aufgeführt werden. MT1-MMP (MMP 14) beispielsweise hat kollagenolytische Aktivität und ist membrangebunden. Knorpel ist nicht vaskularisiert und besteht überwiegend aus zwei Komponenten, dem tripelhelikalen Kollagen Typ II und dem Proteoglykan Aggrecan, welches von im Knorpel eingebetteten Chondrozyten gebildet wird (Hardingham et al., 1992). Die Kollagenasen degradieren natives tripelhelikales Kollagen, die Gelatinasen spalten degradiertes Kollagen und die Stromelysine spalten Proteoglykane. Die Aktivität der MMPs unterliegt einer präzisen Regulation auf mehreren Ebenen. So können Zytokine, Wachstumsfaktoren, Onkogene oder Hormone die meisten MMPs auf Transkriptionsniveau regulieren (Frisch et al., 1987; Spiegel et al., 1996; Fini et al., 1998). Auch gibt es Hinweise auf Regulationsmechanismen auf Ebene der RNA-Stabilität und Translation sowie die Einlagerung des Proteins in sekretorischen Granula von spezifischen Zellen und deren gezielter Freisetzung (Sternlicht & Werb, 2001). Die Aktivierung der in den ECM sezernierten Zymogene erfolgt durch die Abspaltung der Propeptide und die Freisetzung des katalytischen Zentrums. Dabei können die MMPs selbst als solche Aktivatoren fungieren. So konnte gezeigt werden, dass pro-MMP-2 durch MMP-14 und pro-MMP-9 durch MMP-13 in die aktive Form überführt werden kann (Kieseier et al., 1999; Rosenberg, 2002). MMPs werden allgemein durch den Serum-Proteinase-Inhibitor  $\alpha_2$ -Makroglobulin und spezifisch durch Mitglieder der Familie der tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) gehemmt. Diese blockieren das katalytische Zentrum der MMPs durch eine nicht-kovalente Bindung im Verhältnis 1:1. TIMPs können durch direkte Proteinasehemmung als auch durch Komplexbildung in die Regulation der Enzyme eingreifen. TIMP-1 ist der am meisten verbreitete Inhibitor. Das Verhältnis von TIMPs und MMPs ist von Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Balance von degradierenden und remodelierenden Prozessen. So konnte nachgewiesen werden, dass in der rheumatoiden Arthritis bei Hunden die Menge an gebildetem TIMP-1 nicht ausreicht, die Menge an freigesetztem MMP-3 suffizient zu inhibieren (Hegemann et al., 2003). In der rheumatoiden Arthritis haben MMPs an der Degradation der Extrazellulärmatrix und Zerstörung des Knorpels einen wesentlichen Anteil. Sie werden von residenten Zellen des Gelenkgewebes als auch von den einwandernden Zellen gebildet (Murphy et al., 2002).



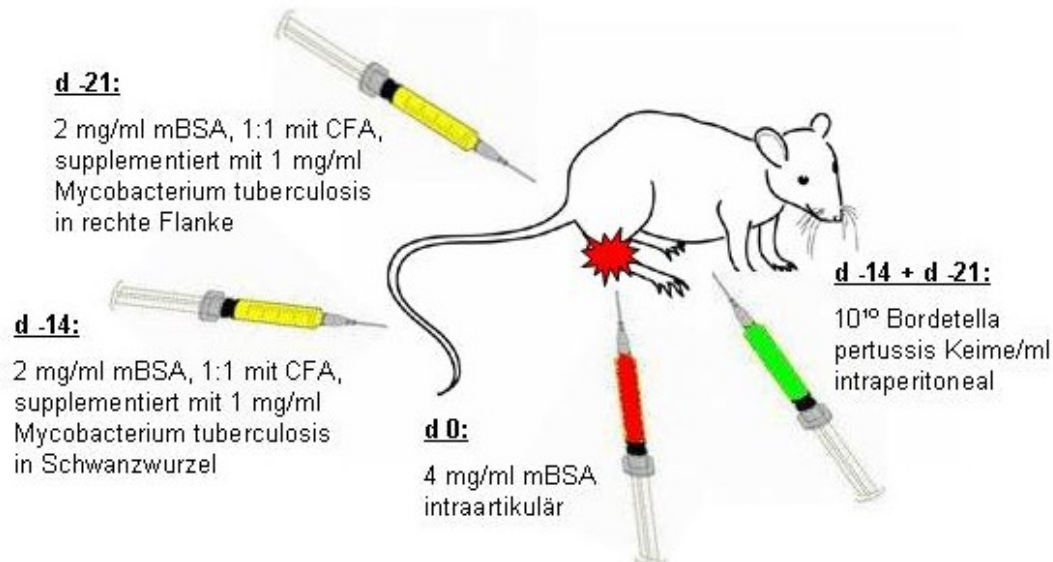
Mitglieder der Cystein- und Aspartatproteinasen tragen ebenfalls zur Knorpeldegradation bei. Es wurde bisher angenommen, daß sie eher eine sekundäre Rolle bei diesen Abbauprozessen spielen, da die Bedingungen für eine optimale Funktion der Enzyme in den Degradationsregionen nicht gegeben sind. Sie benötigen mit Ausnahme von Kathepsin S ein saures Milieu und scheinen nur in Lysosomen und speziellen Umgebungen wie der osteoklastischen Resorptionslakune aktiv zu sein. Allerdings haben aktuelle Untersuchungen gezeigt, daß z. B. sowohl die Kathepsine B, K, L als auch Kathepsin S dafür eine wichtigere Rolle spielen als bisher vermutet (Ikeda et al., 2000; Yasuda et al., 2004). So ist Kathepsin S durch seine starke Proteoglykan-degradierende Aktivität und die extrem effiziente Hydrolyse von Aggrecan bei neutralem und saurem pH-Wert ebenso von wissenschaftlichem Interesse wie Kathepsin K, welches eine einzigartige potente Kollagenaseaktivität aufweist und hauptsächlich von knochen- und knorpelresorbierenden Zellen exprimiert wird (Tezuka et al., 1994; Brömme et al., 1996; Hou et al., 2003). Kathepsin B und L spielen im massiven Wachstum der FLS und der Pannusbildung eine wichtige Rolle, da sie unter anderem an der Destabilisierung von Proteoglykankomplexen und Kollagenfibrillen beteiligt sind (Lemaire et al., 1997).

Kathepsine sind lysosomale Proteinase, die eine wichtige Rolle beim Umsatz von intrazellulären Proteinen spielen. Sie sind sowohl an physiologischen als auch pathologischen Prozessen beteiligt. Sie nehmen Anteil an der Proteinaktivierung, der MHC-II-vermittelten Antigen-Präsentation, am Knochenumbau, der Keratinozytendifferenzierung, am Haarfollikelzyklus, der Reproduktion und der Apoptose (Berdowska, 2004). Sie sind in der Lage Kollagen und Elastin zu spalten (Kirschke et al., 1989; Brömme et al., 1993; Premzl et al., 2003). Normalerweise werden sie nach ihrer Synthese in die Lysosomen transportiert und dort gespeichert. Bei pathologischen Prozessen werden sie allerdings nicht intrazellulär angereichert, sondern durch defektes intrazelluläres Prozessieren direkt ins umgebende Gewebe abgegeben und dort aktiviert. Die erhöhte Expression einiger Kathepsine bei Tumorerkrankungen wird deshalb auch als Prognosemarker angesehen (Mitchell et al., 1993; Sukoh et al., 1994; Shaheen et al., 1995; Budihna et al., 1996; Jedeszko & Sloane, 2004). Die proteolytische Aktivität der Kathepsine wird neben dem Faktor der Genexpression bei der Proteinbiosynthese durch den pH-Wert, das Redoxpotential, der Synthese als inaktive Proform und der Anwesenheit von Cysteinproteinase-Inhibitoren (CPI) reguliert. Man unterteilt die CPI in 4 Familien, die Stefine, die Cystatine, die Kininogene und die Cystatin-verwandten Proteine (Henskens et al., 1996). CPI üben eine reversible Hemmung der Cysteinproteasen aus, indem sie das aktive Zentrum blockieren. Die Inhibition erfolgt ähnlich den TIMPs im Verhältnis 1:1, d.h. ein Cystatinmolekül hemmt ein Molekül der jeweiligen Proteinase. Cystatin C ist der universellste und stärkste Hemmstoff aller Cysteinproteinasen.

Die Stefine A und B zeigen Bindung zu Cathepsin B, H und L. Die Kininogene hemmen Cathepsin L am stärksten, H weniger und B kaum (Barrett et al., 1986).

#### 1.4 Die Antigen-induzierte Arthritis (AIA)

Die Antigen-induzierte Arthritis (AIA) ist ein Modell der RA, bei welchem die Entzündung durch die direkte Applikation eines Antigens in das Kniegelenk einer zuvor gegen das Antigen immunisierten C57/BL6 Maus ausgelöst wird. Es zeigen sich dann im folgenden Verlauf mit der RA vergleichbare klinische und morphologische Parameter bezüglich Gelenkschwellung, Infiltrat, Knorpeldestruktion und Pannusbildung. Das Modell hat die Vorteile einer annähernd genauen Aussage über die Stadien der Entzündung von der akuten bis zur chronischen Phase, so daß auch Aussagen über den frühen Krankheitsverlauf gemacht werden können. Auch ermöglicht es der tierexperimentelle Ansatz Normalgewebe und das Gewebe kontralateraler Gelenke eines Individuums zum Vergleich heranzuziehen. Das Modell der AIA ist ein gut untersuchtes Tiermodell, das schon verschiedenen Forschungsarbeiten zur Vorlage diente (Bräuer et al., 1994; Petrow et al., 1996; Pohlers et al., 2004).



**Abb. 2: Systematische Darstellung des Modells der Antigen-induzierten Arthritis**

### 1.5 Zielstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, cDNA-Arrays mit murinen Proteinase-Sequenzen zu entwickeln und sie anschließend für die Analyse der Proteinase-Expression zunächst im Modell der AIA einzusetzen, um aber auch später in anderen Forschungsprojekten Verwendung zu finden. Mit dieser sehr viel schneller und umfassender einzusetzenden Technik sollte in verschiedenen Versuchen nach entsprechenden Veränderungen auf mRNA-Ebene gesucht werden und dabei die Reliabilität und Validität der cDNA-Arrays überprüft werden. Zur Überprüfung der gewonnenen Ergebnisse wurde die Methode der Real Time PCR und auf Proteinebene die Immunhistochemie eingesetzt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank Cellstar	Sartorius, Göttingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Dispergiergerät Polytron® PT 1200	Kinematica, Littau, Schweiz
DS 34 Polaroid Direct Screen Instant Camera	Polaroid, Dreieich
Elektrophorese Einheit	Biorad Laboratories, München
Elektrophorese Einheit Easy Cast	Separation Systems, Porthmouth, USA
Elektrophorese-Power Supply E734	
Microcomputer	Consort, Tounhout, Belgien
Feinwaage MC1 Analytic Ac 210 S	Sartorius, Göttingen
Gradientencycler	Eppendorf, Hamburg
Heizblock	NeoLab Migge, Heidelberg
Hybridisierungsinkubator 400	Dunn Labortechnik, Asbach
Kamera Canon Powershot G5	Canon, Krefeld
Kühlzentrifuge Jouan CR312	Jouan, Unterhaching
Laminar-Flow-Werkbank	Elektromat, Dresden
Mikro-Dismembrator U	Vitaris, Baar, Schweiz
Mikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Jenamed	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Telaval 31	Carl Zeiss, Jena
PCR-Cycler	Eppendorf, Hamburg
Photometer Kontron UVIKON 860	Kontron Instruments, Eching
Kolbenhubpipetten in verschiedenen Größen	Eppendorf, Hamburg
Präparationsbesteck	Aeskulap, Tuttlingen
Rotorgene 2000	LFT Labortechnik, Wasserburg
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Vortexgerät VF2	IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einmal-Filterspitzen (10, 200, 1000 µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
---	--------------------------------

Einmalspitzen (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Einmalstangenpipetten in verschiedenen Größen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Eppendorftubes in verschiedenen Größen	Eppendorf, Hamburg
Gewebekulturschalen	Nunc, Wiesbaden
Hybridisierungsröhren	Dunn Labortechnik, Asbach
Kodak LX24 Entwickler	PMA Bode, Berlin
Kodak X-Ray Fixierer AL 4	PMA Bode, Berlin
Kodak Röntgenfilme, 18x24 cm	PMA Bode, Berlin
Objekträger und Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Petrischalen (100/20 mm)	Corning Costar, Bodenheim
Polaroid, Schwarzweiß-Sofortbildfilm, Typ 667	Polaroid, Dreieich
Polypropylen- (PP-) Röhrchen (50 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polystyrol- (PS-) Röhrchen (14 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Real Time PCR-Reaktionsgefäße (0,1 ml)	LFT Labortechnik, Wasserburg
Reaktionsgefäße (verschiedene Größen)	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.3 Chemikalien & biologische Stoffe

Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	Braun, Melsungen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
Bactotrypton	Difco <sup>®</sup> , Franklin Lakes, USA
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Casitone	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
DIG-UTP, alkali labile	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTP's	Promega, Mannheim
DTT	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ether	Fischar, Saarbrücken
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
First Strand Buffer	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe

Herring Sperm DNA Solution	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe
mBSA	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
Monensin	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe
Oligo(dT) <sup>12-18</sup> Primer	Promega, Mannheim
Oligo(dT) <sup>15</sup> Primer	Promega, Mannheim
PCR-Puffer	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Qiashredder-Säulen	Qiagen, Hilden
RNA later	Qiagen, Hilden
Salze	J. T. Baker, Phillipsburg, USA
SYBR Green <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
TRIS [Tris (hydroxymethyl) aminomethan]	Sigma-Aldrich, Taufenkirchen
TRIzol <sup>®</sup> Reagent	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin EDTA (10 x Solution)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
X-Gal	Eppendorf, Hamburg
Xylencyanol	Fluka, Buchs, Schweiz
100 bp ladder	Gibco Invitrogen, Karlsruhe

#### 2.1.4 Kit-Systeme

DIG Luminescent Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA-free™ Kit	Ambion, Huntingdon, UK
MasterTaq Kit	Eppendorf, Hamburg
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid DNA Purification Kit	Macherey-Nagel, Düren
RNeasy Midi Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequencing Kit	Epicentre Technologies, Madison, USA
TOPO TA Cloning Kit	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
UltraVision Mouse Tissue Detection System-Anti-Mouse, HRP/DAB	Lab Vision Corporation, Westinghouse, USA
Wizard DNA Clean-up System DNA	Promega, Mannheim

### 2.1.5 Enzyme

Hot Star Taq	Qiagen, Hilden
MMLV-Reverse Transkriptase	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
RNaseOUT™	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase (5 U/ µl)	Eppendorf, Hamburg
Superscript II Reverse Transkriptase	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Taq Polymerase	Eppendorf, Hamburg
Restriktionsendonukleasen (Hind III; Xba I; EcoRI)	

### 2.1.6 Kulturmedien

#### LB-Medium

Hefeextrakt	5 g
Casitone	10 g
NaCl	5 g

auf 1 Liter Aqua bidest auffüllen  
mit NaOH auf pH 7,2 einstellen

#### LB-Platten

Agarose	15 g
---------	------

auf 1 Liter LB-Medium

X-Gal (40 mg/ ml)	1,6 ml
Ampicillin (20 mg/ ml)	5ml

#### Kulturmedium für Synoviozytenkultur:

DMEM	500ml
Hepes	10 mM
Natriumpyruvat	1mM
Penicillin	100 U/ ml
Glutamin	2 mM
Streptomycin	0,1 mg/ ml
FCS (hitzeinaktiviert)	10 % oder 20 %

### 2.1.7 Puffer & Lösungen

#### 1 x PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung):

NaCl                    7,2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>            1,48 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            0,43 g

in 1 Liter Aqua bidest. lösen; pH 7,2

#### 50 x TAE-Puffer:

Tris                    242 g

Eisessig            57,1 ml

0,5 M EDTA        100 ml

mit Aqua bidest. auf 1 Liter auffüllen; pH 8,0

#### 6 x DNA-Ladepuffer:

Saccharose 50 % 5 g

1 M Tris-HCl        200 µl

0,5 M EDTA        40 µl

mit Aqua bidest. auf 10 ml auffüllen

0,02 % Bromphenolblau

0,02 % Xylencyanol

#### 5 x RNA-Ladepuffer:

500 mM EDTA (pH 8,0)

37 % Formaldehyd

Glycerol (100 %) 2 ml

Formamide        3084 µl

10 x MOPS-Puffer 4 ml

#### 10 x MOPS-Puffer:

200 mM MOPS

50 mM Natriumacetat

10 mM EDTA Na<sub>2</sub>

mit Aqua bidest auf 500 ml auffüllen; pH 7,0



**Puffer & Lösungen für die Hybridisierung**

Zusammensetzung der Lösungen unter Verwendung des DIG Luminescent Detection Kit  
(Roche Diagnostics, Mannheim)

Maleinsäure-Puffer

0,1 M Maleinsäure

0,15 M NaCl

pH 7,5 mit NaOH einstellen

Maleinsäure-Tween-Puffer

Maleinsäurepuffer + 0,3 % Tween-20

20 %iges SDS

20 g SDS

ad 100 ml Aqua bidest.

20 x SSC

175,3 g NaCl

88,2 g NaCitrat

in 1 Liter Aqua bidest. lösen, pH-Wert 7,0

Blockierungsstammlösung 10 %ig

20 g Blocking Reagenz

ad 200 ml Maleinsäure-Puffer

Blockierungsarbeitslösung

2,5 ml Blockierungsstammlösung

10,0 ml Maleinsäure-Puffer

Detektions-Puffer

0,1 M Tris-HCl pH 8,0

0,1 M NaCl

pH 9,5 mit NaOH einstellen

Substratlösung

2 ml Detektions-Puffer

13 µl CSPD

**Puffer für die Immunhistochemie**Waschpuffer

20 x PBS 100 ml

Aqua dest. 1,9 Liter

Tween 20 200 µl

20 x PBSNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 2,88 %KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 %

NaCl 16 %

KCl 0,4 %

in 1 Liter Aqua bidest. lösen; pH 7,4

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herstellung der cDNA-Arrays

Zur Herstellung der cDNA-Arrays wurde eine Datenbankrecherche ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov); [www.expasy.org](http://www.expasy.org)) zum Auffinden von relevanten Proteinasen durchgeführt. Danach erfolgte die Suche nach spezifischen cDNA-Sequenzen der Proteinasen und ihrer Inhibitoren mit der Software DNASTAR und Blast-search ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). Es schloß sich eine Internetrecherche zum Vorkommen der Zielkandidatengene im murinen Organismus an, um eine gezielte Extraktion von mRNA vornehmen zu können.

Zur Gewinnung der zu spottenden cDNA musste zunächst mRNA aus murinem Gewebe isoliert werden. Dazu wurden zwei weibliche Mäuse vom Stamm Balb/c präpariert, die Organe entnommen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die RNA-Isolation aus den Organen erfolgte nach Protokoll des verwendeten RNeasy® Midi Kit (Qiagen). Dazu mußte zuerst eine Zerkleinerung des zur RNA-Isolation verwendeten Gewebes erfolgen, welches mit Mörser und Stößel erreicht wurde. Das ganze Procedere erfolgte unter stetiger Kühlung von Proben und Geräten, um ein Auftauen der Probe und der damit verbundenen vorzeitigen Degradation der RNA vor einem guten Aufschluß des Gewebes zu vermeiden. Danach wurde das zerkleinerte Gewebe mit dem Lysepuffer RLT versetzt und anschließend durch mehrfaches Aufziehen mit einer Spritze homogenisiert. Dabei richtete sich die initiale Gabe des mit 1 µl β-Mercaptoethanol pro ml versetzten Lysepuffers RLT nach der zu erwartenden Menge RNA, welche sich aus der Art und dem Gewicht des verwendeten Organs nach dem Qiagen Manual für RNeasy® Midi Kit berechnen ließ (Tab. 2).

**Tab. 2: Volumen von Lysepuffer RLT (in ml) zur Isolation von Gesamt-RNA aus Tiergewebe unter Verwendung des RNeasy® Midi Kit.** \* Bei der Aufbereitung von schwierig zu zerkleinerndem Gewebe, empfahl sich die Verwendung von 4 ml RLT Lysepuffer bei mehr als 75 mg Gewebe.

Menge des Gewebes (mg)	Lysepuffer RLT (ml)
20-75	2,0
75-130	2,0 (4,0)*
130-250	4,0

Auch aus murinen Embryonen (C57BL/6; 10-15 Tage alt) und den Zelllinien NIH 3T3 (murine fibroblastenähnliche Embryozelllinie) und BaF3 (murine hämatopoetische Zelllinie) wurde nach dem gleichen Protokoll unter Verwendung des RNeasy® Mini Kit (Qiagen) Gesamt-RNA isoliert. Anschließend erfolgte eine reverse Transkription mit in Tabelle 3 aufgeführtem Ansatz.

**Tab. 3: Ansatz zur reversen Transkription von isolierter RNA.**

Reagenzien	Menge je Probe
RNA	2,5 µg
Oligo-dT <sup>15</sup> Primer (Promega)	1 µl
Aqua dest.	auffüllen auf 5 µl Ges.-vol.
Inkubation für 5 min bei 80°C, anschließend 5 min auf Eis	
5 x First Strand Puffer (Gibco Invitrogen)	2 µl
0,1 M DTT (Gibco Invitrogen)	1 µl
dNTPs (10 mM each; Promega)	1 µl
MMLV-RT (200 U/ µl; Gibco Invitrogen)	0,5 µl
RNase™ OUT (40 U/ µl; Gibco Invitrogen)	0,5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10 µl</b>

Nach reverser Transkription bei 37°C für 1 h wurde eine PCR mit spezifischen Primern (Kap. 3.1, Tab. 14) durchgeführt, um die cDNA der Proteinasen zu gewinnen. Tabelle 4 zeigt den verwendeten Ansatz.

**Tab. 4: Ansatz für PCR zur Amplifikation der per reverser Transkription gewonnenen cDNA.**

Reagenzien	Menge je Probe
cDNA	4 µl
Aqua dest.	20 µl
5 x Taq Enhancer (Eppendorf)	10 µl
5 x PCR-Puffer (1,5 mM; Eppendorf)	10 µl
dNTPs (10 mM each; Promega)	1,5 µl
Primer 1+2 (10 µM each)	4 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/ µl; Eppendorf)	0,5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µl</b>

Da die verschiedenen Primer unterschiedliche Annealingtemperaturen haben, wurde versucht, eine PCR mit Primern einer annähernd gleichen Annealingtemperatur durchzuführen (Tab. 5).

**Tab. 5: Übersicht über die Annealingtemperaturen der Primer und der schließlich zur Durchführung der PCR gewählten Annealingtemperatur.**

<b>Proteinase</b>	<b>Annealingtemp. Primer</b>	<b>gewählte Annealingtemp. für PCR</b>
Kathepsin S	49,5°C	50°C
Stefin 1	49,9°C	
Stefin 4	51,7°C	52°C
TIMP-1	51,5°C	
Caspase 8	53,5°C	53°C
Stefin 2	52,6°C	
Stefin 3	52,9°C	
Caspase 1	55,8°C	56°C
Caspase 11	56,2°C	
Caspase 12	56,4°C	
MMP-3	56,1°C	
MMP-7	55,3°C	
MMP-8	55,5°C	
MMP-12	56,3°C	
PAI-2	56,5°C	
Caspase 3	57,3°C	57°C
Caspase 6	57,4°C	
Caspase 7	57,2°C	
MT3-MMP	57,7°C	
uPAR	57,7°C	
R13a	57,8°C	
β-Aktin	57,8°C	
Caspase 2	58,1°C	58°C
Caspase 14	58,4°C	
Kathepsin B	58,4°C	
Kathepsin H	58,6°C	
Kathepsin K	58,7°C	
Kathepsin L	58,4°C	
Kathepsin Z	58,1°C	
Cystatin B	58,2°C	
MMP-10	58,0°C	
TIMP-2	58,9°C	
TIMP-3	58,2°C	
Caspase 9	59,8°C	60°C
Kathepsin D	59,8°C	

Proteinase	Annealingtemp. Primer	gewählte Annealingtemp. für PCR
Kathepsin F	59,8°C	60°C
Kathepsin W	60,4°C	
Cystatin C	59,8°C	
MMP-2	59,2°C	
MMP-9	60,1°C	
MMP-11	59,4°C	
MMP-14	59,6°C	
MMP-15	60,3°C	
MMP-21	59,3°C	
uPA	59,1°C	
GAPDH	60,6°C	
<b>MT4-MMP</b>	<b>61,5°C</b>	<b>61,5°C</b>

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

1. 94°C für 3 min
2. spez. Annealingtemp. (siehe Tab. 5) für 35 sek
3. 72°C für 2 min
4. 94°C für 20 sek
5. spez. Annealingtemp. (siehe Tab. 5) für 35 sek
6. 72°C für 45 sek
7. 35 Wiederholungen von Schritt 4-6
8. 94°C für 20 sek
9. spez. Annealingtemp. (siehe Tab. 5) für 35 sek
10. 72°C für 10 min
11. 4°C ∞

Anschließend wurden die Proben mit Bromphenolpuffer zum Beschweren und Sichtbarmachen versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Bei richtiger Länge wurde das Produkt nach Protokoll des verwendeten TOPO TA Cloning Kit in den pCR®II-TOPO®-Vektor eingebracht (Tab. 6).

**Tab. 6: Ligationsansatz zur Klonierung von durch RT-PCR gewonnener cDNA.**

Reagenzien	Menge je Probe
cDNA	2 µl
Aqua dest.	2 µl
Salt-Solution	1 µl
pCR®II-TOPO®-Vektor	1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>6 µl</b>

Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz auf Eis gestellt. Anschließend wurden 4 µl des Ansatzes mit einem Aliquot TOP10F' (One Shot<sup>®</sup> Chemically Competent Escherichia coli) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Eine Erwärmung der Zellen auf 42°C für 30 sek bewirkte die Transformation, gefolgt von einer 2 minütigen Inkubation auf Eis. 50 µl dieses Gemisches wurde auf angewärmten mit X-Gal und Ampicillin versetzten LB-Platten (Kap. 2.1.6) ausplattiert. Die Zugabe von Ampicillin erlaubt das Wachstum von ampicillin-resistenten Kolonien. X-Gal dient der Identifizierung der Kolonien, welche das klonierte Genfragment in sich tragen. Die Klonierungsstellen liegen in der Region, welches für ein Fragment der β-Galaktosidase kodiert und bei erfolgreichem Einbau eines DNA-Fragments inaktiviert wird. Die Blaufärbung kommt durch den Abbau von X-Gal durch β-Galaktosidase zustande. Deshalb stellen sich Kolonien mit dem entsprechenden Genfragment als weiße Kolonien dar, während Kolonien ohne Genfragment blau erscheinen. Die weißen Klone wurden mit sterilen Spitzen abgenommen und in LB-Medium bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach Zentrifugation (8500 rpm, 5 min, 21°C) wurde die Isolation der in dem Pellet enthaltenen Plasmid-DNA nach Protokoll des verwendeten NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid DNA Purification Kit von Macherey-Nagel durchgeführt. Ein Restriktionsverdau mit EcoR I (Gibco Invitrogen) zur Überprüfung der Fragmentgröße beschloß das Procedere (Tab. 7).

**Tab. 7: Ansatz zum Restriktionsverdau zur Überprüfung der Fragmentgröße von durch Klonierung gewonnener Plasmid-DNA.**

Reagenzien	Menge je Probe
EcoR I (10 U/ µl; Gibco Invitrogen)	0,3 µl
React 3 (Gibco Invitrogen)	1 µl
Aqua dest.	5,7 µl
Plasmid-DNA	3 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10 µl</b>

Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C wurde der Verdau auf einem Agarosegel überprüft. Hatte das zu untersuchende Fragment eine EcoR I-Schnittstelle, erfolgt der Restriktionsverdau mit Xba I und/ oder Hind III mit den entsprechenden Puffern (React 2; Gibco Invitrogen). Anschließend wurde das gewonnene Produkt sequenziert. Nach Vorbereitung der Proben mit dem SequiTherm EXCEL<sup>™</sup> II DNA Sequencing Kit von Epicentre Technologies wurde die Sequenzierung von Fr. Schade am Institut für Biochemie I durchgeführt. Nach erneuter PCR wurde das Produkt mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kit von Qiagen aufgereinigt und die Konzentration bestimmt. Mit einer Konzentration von 5 ng cDNA pro Spot erfolgte das Auftragen der cDNA auf Membranen im Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilian-Universität München unter Leitung von PD Dr. Klein.

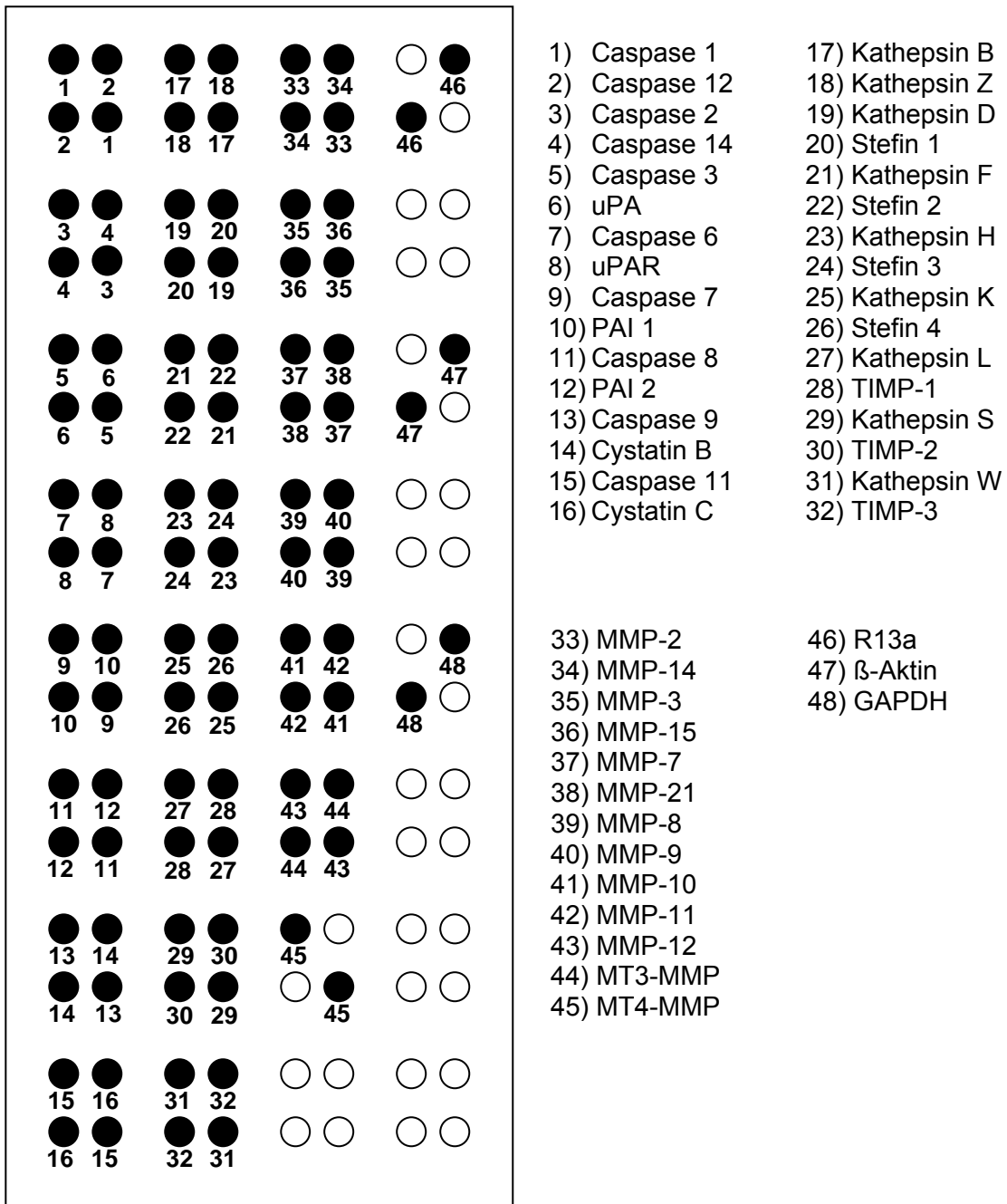


Abb. 3: cDNA-Array-Muster. Anordnung der cDNA-Spots auf der Nylon-Membran.

## 2.2.2 Einsatz der cDNA-Arrays im Modell der Antigen-induzierten Arthritis

### 2.2.2.1 Modell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA)

Weibliche 8-10 Wochen alte C57BL/6-Mäuse wurden mit 100 µl Antigen-Adjuvanz 21 Tage vor Arthritisinduktion (-21 Tage) subkutan in die rechte Flanke und erneut nach 7 Tagen (-14 Tage) dorsal in die Schwanzwurzel immunisiert (Antigen-Adjuvanz = 100 µg mBSA [2 mg/ml] gelöst in 50 µl physiologischer Kochsalzlösung und steril filtriert, emulgiert mit 1 Volumen kompletten Freund'schen Adjuvanz [supplementiert mit 2 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37RA; Difco, Detroit, USA]). Zur Unterstützung der Immunantwort wurden den Tieren an den Tagen -21 und -14  $2 \times 10^9$  hitzeinaktivierte *Bordetella pertussis* Keime (Chiron Behring, Marburg) intraperitoneal appliziert.

Am Tag 0 wurde die Arthritis unter Ethernarkose durch intraartikuläre Injektion des Antigens (100 µg mBSA in 25 µl physiologischer Kochsalzlösung, steril filtriert) in das rechte Kniegelenk ausgelöst. Die akute Entzündung beginnt unmittelbar nach Induktion der Arthritis, geht nach ca. 7 Tagen (Tag 7) in eine chronische Entzündung über und persistiert für 3 bis 6 Monate.

Die Tiere stammen vom Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena und von Charles River, Sulzfeld, Deutschland. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden; Fütterung mit Altromin-Pellets # 1326, Lage).

### 2.2.2.2 Präparation der Kniegelenke für direkte RNA-Isolation

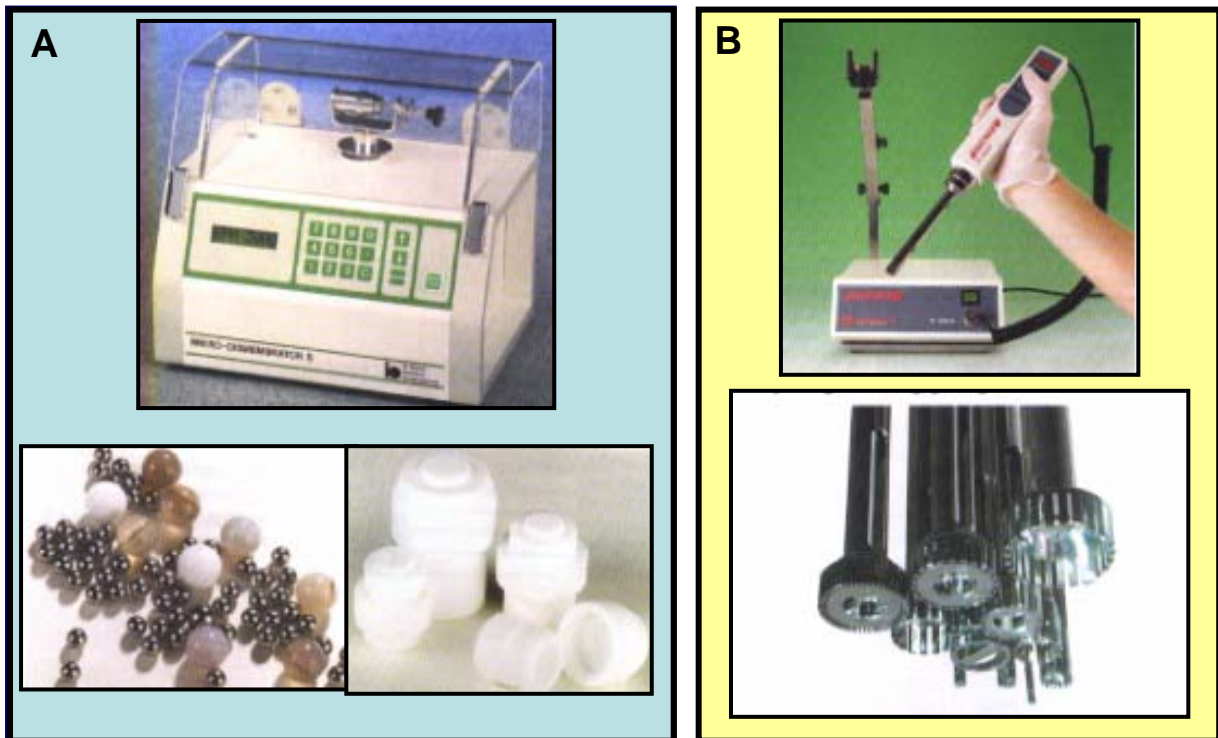
Die Versuchstiere wurden am Tag 0, 1, 3, 7, 14 und 21 nach Arthritisinduktion unter Ethernarkose durch einen Schnitt in die Arteria carotis communis entblutet, durch zervikale Dislokation getötet und in 70%igem Alkohol desinfiziert. Die Freilegung der Kniegelenke erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Kniegelenke wurden entnommen, soweit möglich von Muskeln und Sehnen befreit und im Gelenkspalt aufgeschnitten. Anschließend wurden sie zur Stabilisierung bis zur Aufarbeitung in RNA later (Qiagen, Hilden) gegeben.

### 2.2.2.3 Isolation der RNA direkt (*in vivo*) aus Kniegelenken

Zur Isolation der Gesamt-RNA wurden die Gelenke dem RNA later entnommen und in Stickstoff gegeben. Anschließend wurden die gefrorenen Gelenke in ebenfalls vorgekühlte Teflongefäße gegeben, in denen sich eine Kugel befand. Dieses Gefäß wurde dann in den Mikro-Dismembrator U eingespannt und das Gelenk wurde durch hochfrequentes Schütteln



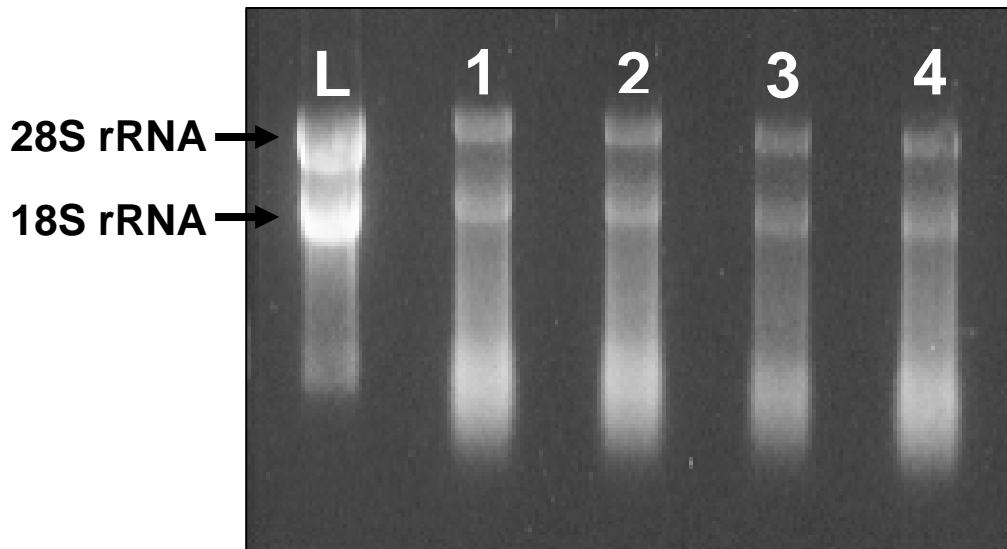
von der Kugel zertrümmert. Danach wurde das zu Pulver zerkleinerte Gelenk in 1 ml TRIzol<sup>®</sup> überführt und 90 sek mit dem Dispergiergerät Polytron<sup>®</sup> PT 1200 nochmals zerkleinert und homogenisiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Gründlichem Mischen und einer erneuten Inkubation von 2 min bei RT schloss sich eine Zentrifugation (11 000 rpm, 15 min, 4°C) an. Dabei erfolgte die Phasentrennung. In der oberen wässrigen farblosen Phase befand sich die mRNA, welche abpipettiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach Zugabe mit 500 µl Isopropanol mit 15 min Inkubation bei 30°C erfolgte in einem anschließenden Zentrifugationsschritt (13 000 rpm, 15 min, 4°C) eine Fällung. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation mit 13 000 rpm, 5 min, 4°C und Verwerfen des Überstandes). Das Pellet wurde bei 37°C getrocknet, mit 50 µl Aqua dest. resuspendiert und bei RT 10 min inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte mRNA bei -70°C gelagert.



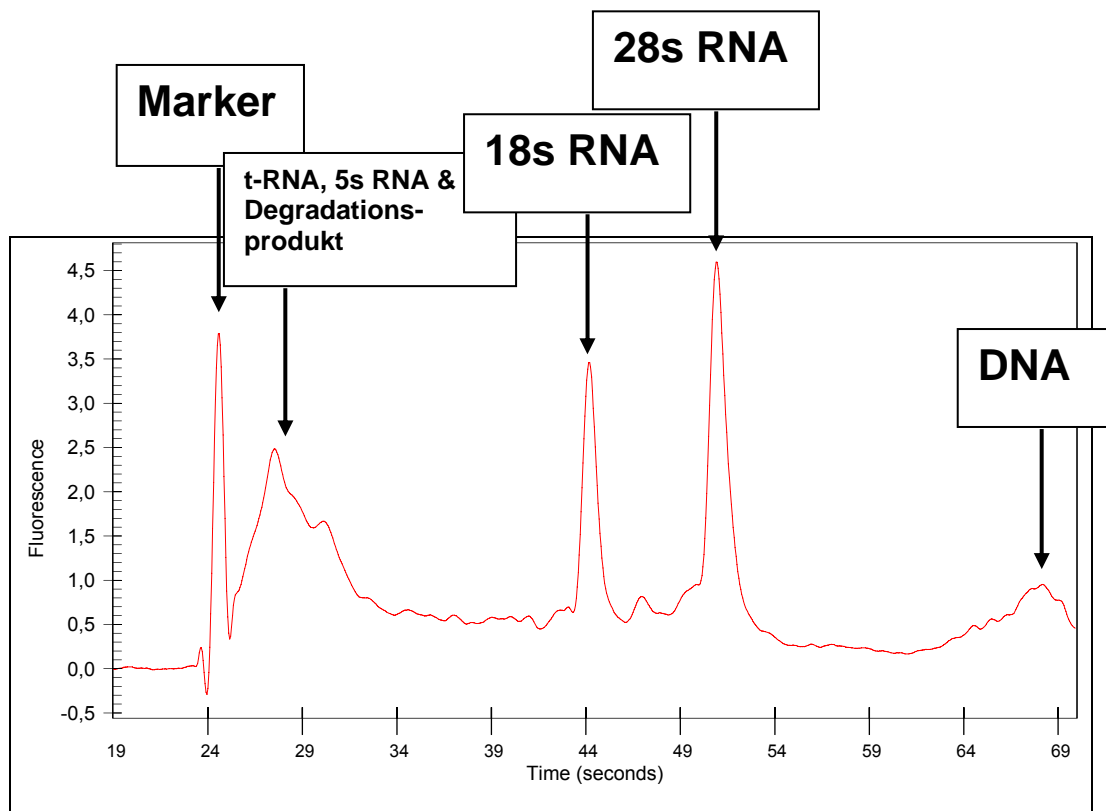
**Abb. 4: Geräte zur Zerkleinerung der entnommenen Kniegelenke. A:** Mikro-Dismembrator U mit Zubehör der Fa. Vitaris. **B:** Dispergiergerät Polytron<sup>®</sup> PT 1200 der Fa. Kinematica.

mRNA, die einer Analyse auf cDNA-Arrays respektive Real Time PCR unterzogen wurde, mußte qualitativ auf einem MOPS(4-, 3-Morpholinpropansulfonsäure)-Gel überprüft werden. War die Bande der ribosomalen 28s RNA doppelt so intensiv auf dem Gel zu sehen als die Bande der 18s Bande, konnte man davon ausgehen, das auch die mRNA, welche einen Anteil von 0,5 % an der Gesamt-RNA ausmacht, nicht degradiert ist (Abb. 5) und für die

Untersuchung genutzt werden kann. Zusätzlich wurde noch eine Elektrophorese der RNA durchgeführt, bei der die Fluoreszenzsignale der beiden ribosomalen RNA als Peaks abgebildet und in Bezug auf die Größe der Peaks von Marker und Degradationsprodukten gemäß einer Vorlage beurteilt wurden.



**Abb. 5: Überprüfung der Qualität von mRNA auf MOPS-Gel.** L=mRNA aus Leber, 1-4=mRNA aus murinen Kniegelenken.



**Abb. 6: Ergebnis der Untersuchung gewonnener intakter mRNA mittels RNA 6000 Nano Chips mit Bioanalyser 2100 der Firma Agilent.**

#### 2.2.2.4 Präparation der Kniegelenke für Kultivierung von Synoviozyten

Die Versuchstiere wurden am Tag 0 vor dem Auslösen der AIA und am Tag 7 nach Arthritisinduktion unter Ethernarkose entblutet, durch zervikale Dislokation getötet und in 70%igem Alkohol desinfiziert. Die Freilegung der Kniegelenke erfolgte unter sterilen Bedingungen. Muskel- und Fettgewebe wurden bis die Knochen entfernt. Die Patella und die gelenkbeteiligten Strukturen von Femur und Tibia wurden einzeln herauspräpariert, so dass das Synovium freilag. Die Kultivierung erfolgte in 2 ml DMEM mit 20 % FCS für 8 Tage in 12-Well-Platten (Corning Costar, Bodenheim) mit einem Gelenk pro Well. Das Medium wurde täglich vollständig erneuert. Am Tag 7 wurden die Gelenkstücke entnommen. Das Auswachsen der FLS wurde mikroskopisch verfolgt. Am Tag 8 erfolgte die 1. Zellpassage. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen wurden zweimal mit 1 ml PBS gespült und anschließend mit 0,5 ml 1xTrypsin pro Well von der Kulturplatte gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 7 min bei 37°C wurden verbleibende adhärenente Zellen mit einem Zellschaber (Greiner Bio-One, Frickenhausen) abgelöst. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1200 rpm, 7 min, 21°C) und das Pellet in DMEM mit 10 % FCS gelöst. In ein Well einer 6-Well-Platte wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 2,5 ml eingesät. Am nächsten Tag wurde ein Wechsel des Mediums vorgenommen. Die 2. und 3. Passage, die genau wie die 1. Passage durchgeführt wurden, erfolgten nach 3 bzw. 6 weiteren Tagen. Nach einem letzten Wachstumstag wurde schließlich am Tag 16 die RNA isoliert.

#### 2.2.2.5 Isolation der RNA aus kultivierten Synoviozyten

Die Isolation der RNA aus kultivierten Synoviozyten erfolgte einen Tag nach der dritten Zellkulturpassage nach dem Protokoll des verwendeten RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit von Qiagen, Hilden. Zur Vorbereitung wurden die Zellen zur Entfernung des Serum mit PBS (37°C) gewaschen. Anschließend begann die RNA-Isolation mit der Lyse der Zellen durch 500 µl β-Mercaptoethanol-Lysepuffer-Gemisch pro Well. Die isolierte RNA wurde mit Aqua dest. gelöst und bei -70°C gelagert. Der DNase Verdau erfolgte zu Beginn der reversen Transkription (Kap. 2.2.3.1).

## 2.2.2.6 Hybridisierung der cDNA-Arrays

**Herstellung der Hybridisierungssonde**

Um RNA-Proben einer Analyse auf cDNA-Arrays zuzuführen, wurden sie vorher mit Digoxigenin markiert. Dieser Schritt erfolgte während der reversen Transkription durch den Einbau von DIG-11-dUTP. Die RNA wurde mit einem Oligo-dT<sup>15</sup>-Primer und Wasser versetzt und durch Erhitzen auf 65°C für 15 min denaturiert. Anschließend wurde ein Mastermix aus RT-Puffer, DTT, dNTP's und DIG-dUTP, RNase<sup>TM</sup>OUT und Superscript<sup>TM</sup> II zu den Proben gegeben, gut gemischt und 1 h bei 37°C im Cycloer inkubiert (Tab. 8).

**Tab. 8: Ansatz für Digoxigeninmarkierung während reverser Transkription.**

Reagenzien	Menge je Probe
RNA	2 µg
Oligo-dT15 Primer (Promega)	1 µl
Aqua dest.	auffüllen auf 5 µl Ges.-vol.
Inkubation für 15 min bei 65°C, anschließend 3 min auf Eis	
5 x First Strand Puffer (Gibco Invitrogen)	4 µl
100 mM DTT (Gibco Invitrogen)	1 µl
dNTPs – dATP, dCTP, dGTP (5 mM each; Promega)	1 µl
dTTP (3,25 mM; Promega)	1 µl
DIG-dUTP, alkali-labil (1 mM; Roche)	1 µl
RNase <sup>TM</sup> OUT (40 U/ µl; Gibco Invitrogen)	0,5 µl
Superscript <sup>TM</sup> II Reverse Transkriptase (200 U/ µl; Gibco Invitrogen)	0,5 µl
Aqua dest.	6 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>

Durch Zugabe von 1 ml 200 mM EDTA wurde die Reaktion schließlich abgestoppt. Danach wurden 2 µl 4M LiCl und 60 µl eiskaltes 96%iges Ethanol zur Präzipitation der Probe gegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei -70°C erfolgte nach einem Zentrifugationsschritt (13 000 rpm, 15 min, 4°C) die Fällung der Sonde zur Abtrennung der freien Nukleotide. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (13 000 rpm, 5 min, 4°C) wurde das Pellet bei 37°C getrocknet und anschließend mit 50 µl Aqua dest. resuspendiert.

## Hybridisierung der cDNA-Arrays

Zur Hybridisierung wurden die cDNA-Arrays mindestens 4 Stunden vorhybridisiert. Dazu wurde die Membran mit Aqua dest. angefeuchtet und in einem Greiner-Röhrchen im Hybridisierungssofen angewärmt. Anschließend wurden 5 ml auf 68°C vorgewärmte DIG Easy Hyb Hybridisierungslösung dazu gegeben. 90 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ ml) wurden mit 1 ml DIG Easy Hyb Hybridisierungslösung versetzt und bei 95°C für 10 min im Cycler denaturiert. Dieses Gemisch wurde ebenfalls zur Membran pipettiert und dann für 4 h bei 42°C im Hybridisierungssofen inkubiert. 50 µl der sondenmarkierten Probe wurde zusammen mit 90 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ ml) und 1 ml DIG Easy Hyb Hybridisierungslösung für 10 min bei 95°C im Cycler denaturiert. Nach der Prähybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung entfernt und 2 ml auf 68°C vorgewärmte DIG Easy Hyb Hybridisierungslösung zu der Membran gegeben. Anschließend wurde das Gemisch aus denaturierter Sonde, Heringssperma-DNA und DIG Easy Hyb Hybridisierungslösung dazupipettiert. Nach 48 Stunden Inkubation bei 42°C im Hybridisierungssofen folgten mehrere Waschstreps, bei der die Membran in absteigenden Konzentrationen von SSC (Tab. 9) gewaschen wurde.

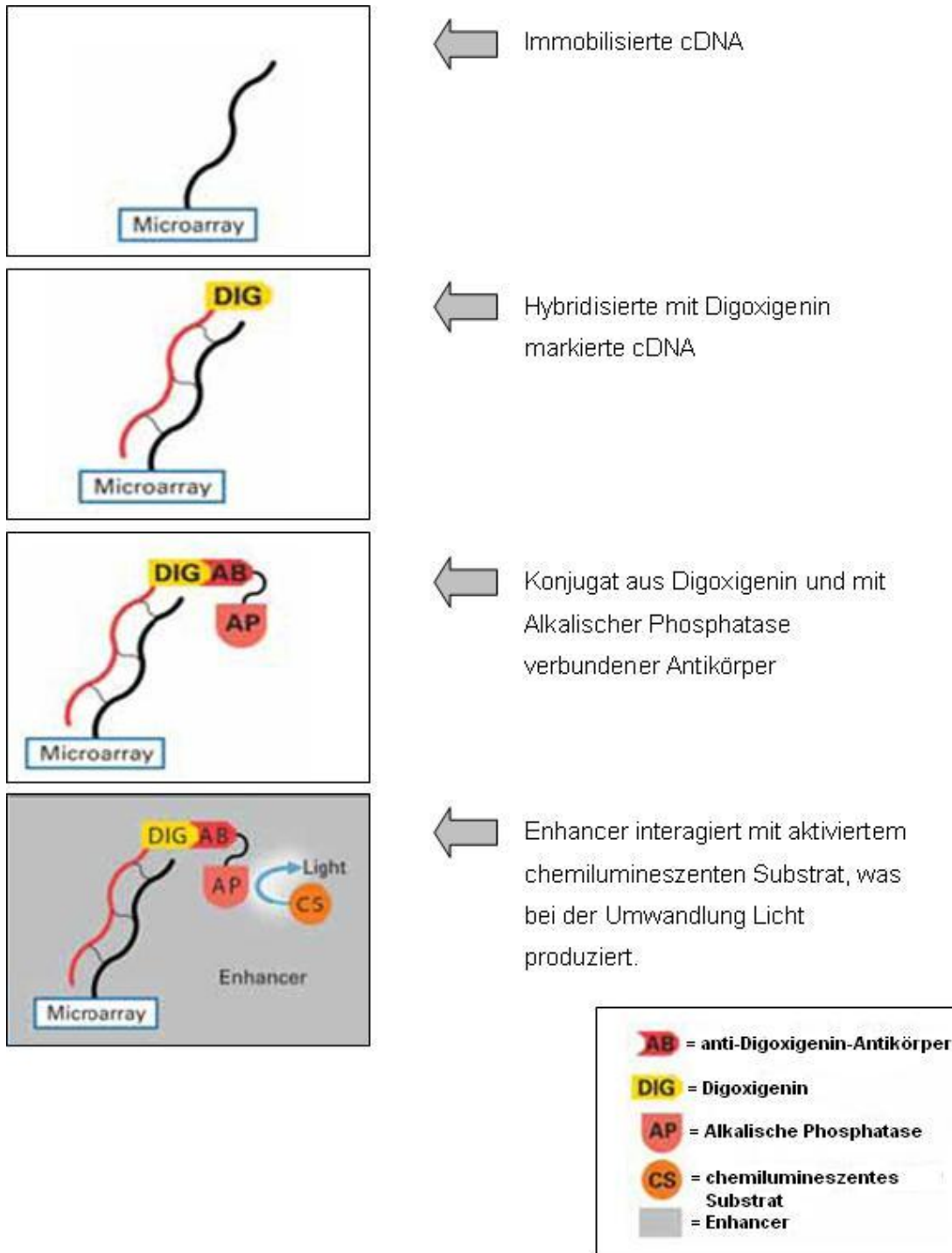
**Tab. 9: Zusammensetzung der Waschpuffer.** Zusammensetzung von Stammlösung 20 x SSC und 20 % SDS in Kap. 2.1.7.

Waschpuffer	Zusammensetzung
1	2 x SSC + 0,1 % SDS
2	1 x SSC + 0,1% SDS
3	0,5 x SSC + 0,1 % SDS
4	0,1 x SSC + 0,1 % SDS

Nach 5 min bei RT in 200 ml Waschlösung 1 folgten weitere 5 min bei RT in 200 ml Waschlösung 2. Danach wurden die Membranen 2 x 15 min bei 60°C in 500 ml Waschlösung 3 im Wasserschüttelbad gewaschen. Anschließend folgten 2 x 45 min bei 60°C in 500 ml Waschlösung 4 im Wasserschüttelbad.

## Entwicklung der Membran

Zum Entwickeln wurde die Membran 5 min in Maleinsäure-Tween-Puffer (Kap. 2.1.7) gewaschen. Danach wurde die Membran für 30 min in 50 ml Blockierungsarbeitslösung (Kap. 2.1.7) inkubiert. Dieser Schritt diente zur Absättigung eventuell vorhandener Bindungsstellen. Danach wurde der Antikörper gegen Digoxigenin auf die Membran gegeben, der mit 5 µl auf 50 ml Blockierungsarbeitslösung in einer Endkonzentration von 75 U/ml für 30 min inkubieren mußte. Nach erneutem Waschen in 100 ml Maleinsäurepuffer für 2 x 15 min bei RT wurde die Membran für 5 min in 20 ml Detektionspuffer äquilibriert. Dann wurde die Membran auf eine Folie gegeben und 10 ml des Substrats CSPD wurde gleichmäßig auf der Membran verteilt. Dann wurden die Arrays in der Folie in eine Fotokassette gelegt und in der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm aufgelegt. Der Film sollte unterschiedlich lange belichtet werden um Unterschiede bei stark oder schwach exprimierten Genen noch gut erkennen zu können. Danach wurde der Film entwickelt und eingescannt, um mit der Software Scion Image ausgewertet zu werden. Dabei wurde die Intensität jedes Spots gemessen und einmal gegen den Hintergrund und anschließend gegen das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin abgeglichen. Jede cDNA ist auf dem Array im Duplikat vorhanden. So konnte zum Schluß der Mittelwert der beiden Messwerte gebildet werden.



**Abb. 7: Detektionsprinzip der cDNA-Arrays.**  
 nach <http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/00113264.pdf>

### 2.2.3 Validierung der cDNA-Array-Ergebnisse durch Real Time PCR

#### 2.2.3.1 DNase-Verdau und Reverse Transkription

Bevor die RNA für ihren Einsatz in der Real Time PCR revers transkribiert werden konnte, mußte sie vorher einem DNase-Verdau unterzogen werden, um eventuell vorhandene genomische DNA zu eliminieren, die zu einem verfälschten Ergebnis der Messung geführt hätte.

Der DNase-Verdau erfolgte mit dem DNA-free™ Kit von Ambion. Dazu wurden jeweils 5 µg RNA jeder Probe mit Aqua dest. auf ein Volumen von 22 µl ergänzt und mit 1 µl DNase I (2 U/ml) bzw. 2 µl 10 x DNase I Puffer versetzt, so dass sich das Gesamtvolumen auf 25 µl belief. Nach einer 45 minütigen Inkubation bei 37°C wurden 5 µl des DNase Inactivation Reagent dazugegeben, um den Abbau von in der nachfolgenden reversen Transkription gebildeten cDNA durch die DNase I zu verhindern. Nach 2 minütiger Inkubation und Zentrifugation (10 000 rpm, 1 min, 21°C) wurden 20 µl des entstandenen Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 15 Minuten bei 65°C denaturiert. Anschließend wurde die RNA durch die Reverse Transkription mit der Superscript™ II in cDNA umgeschrieben, wobei der in Tab. 10 aufgeführte Mastermix verwendet wurde.

**Tab. 10: Mastermix für die reverse Transkription.** Der CDS Primer wurde von Dr. E. Birch-Hirschfeld vom Institut für Virologie der FSU Jena synthetisiert.

Reagenzien	Menge je Probe
RNA	20 µl
5 x First Strand Puffer (Gibco Invitrogen)	10 µl
0,1 M DTT (Gibco Invitrogen)	5 µl
dNTPs (10 mM each; Promega)	5 µl
CDS-Primer (50 µM)	2 µl
Superscript™ II Reverse Transkriptase (200 U/ µl; Gibco Invitrogen)	1 µl
Aqua dest.	7 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µl</b>

Als Kontrollen dienten bei jedem Versuchsansatz zwei RNA-Proben von L929-Zellen, einer immortalisierten Bindegewebsfibroblastenzelllinie, die sowohl beim DNase-Verdau als auch bei der Reversen Transkription mitgeführt wurde. Die Reverse Transkription erfolgte bei 42°C für 60 Minuten im Cycler. Danach wurde eine Fällung mit 4M LiCl und 96%igem Ethanol für 15 Minuten bei -70°C durchgeführt, um im anschließenden Waschschrift in der Lösung



vorhandene Salze zu entfernen. Nach einer Zentrifugation (13 000 rpm, 15 min, 4°C) wird das Pellet mit 500 µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (13 000 rpm, 5 min, 4°C) und bei 37°C getrocknet. Das Pellet wurde dann mit 50 µl Aqua dest. resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die synthetisierte cDNA bei -70°C gelagert.

### 2.2.3.2 Real Time PCR

Die quantitative PCR der zu untersuchenden Proben wurde im Rotorgene 2000 von Corbett Research durchgeführt. In den meisten Fällen konnten die bei der Entwicklung der cDNA Arrays zusammengetragenen Primer benutzt werden, aber bei einigen Untersuchungen musste zunächst noch eine zusätzliche Primersuche erfolgen, wenn die vorhandenen Primer für cDNA-Bereiche von > 500 bp amplifizieren. Die cDNA-Sequenzen, die bei einer Real Time PCR amplifiziert werden, sollten eine Länge von 200 bp nicht überschreiten, da die Taq-Polymerase an längeren Strängen nicht optimal funktionieren kann. Diese zusätzliche Primersuche gestaltete sich ähnlich wie bei der cDNA-Array-Entwicklung. Es wurde darauf geachtet, dass die Primer innerhalb des Abschnittes der Primer für die cDNA-Arrays lagen.

Als Fluoreszenz-Farbstoff wurde SYBR Green I verwendet, ein Farbstoff, der sich an Doppelstränge anlagert und für relative Konzentrationsbestimmungen via Real Time PCR geeignet ist. Der Anstieg der Fluoreszenz während der Real Time PCR korreliert proportional mit der gebildeten Produktmenge. Um Untersuchungen mittels Real Time PCR durchführen zu können, mußte man als erstes durch Optimierungsversuche die geeignete SYBR Green-Konzentration bestimmen, die genug Fluoreszenz-Signale erzeugt, aber nicht die PCR inhibiert.

Anschließend wurden aus Plasmid-DNA (Clonierung nach Protokoll des verwendeten Topo TA Cloning Kit, Gibco Invitrogen, Karlsruhe; Isolierung der Plasmid DNA nach Protokoll des verwendeten NucleoSpin® Plasmid DNA Purification Kit, Macherey-Nagel, Düren) des zu untersuchenden Genes unter Berechnung von Vektor- und Insertgröße Standards hergestellt, welche zur Erstellung einer Standardkurve dienten, mit deren Hilfe später die Konzentration der Probe in Bezug auf die Standardkurve berechnet werden konnte. Dadurch konnte die Quantifizierung der PCR unabhängig von der absoluten Menge an PCR-Produkten erfolgen. Für die Reaktion wurde SYBR Green I 1:10 000 in DMSO verdünnt. Als Enzym wurde HotStarTaq mit den entsprechenden Puffern (Qiagen, Hilden) verwendet. Es wurde in einem Volumen von 25 µl gearbeitet. Dazu wurde zunächst ein Mastermix mit spezifischen Primern (Kap. 3.3, Tab. 15) in einem Volumen von 15 µl hergestellt (Tab. 11). Vor Reaktionsbeginn erfolgte die Zugabe von 1 µl DNA (1µg/ µl) in 9 µl Aqua dest. Jede

Probe wurde im Duplikat untersucht. Bei jeder Messung wurde eine Negativkontrolle (entspr. Mastermix ohne DNA) mitgeführt.

**Tab. 11: Mastermixansatz für Real Time PCR.** Die Primer wurden von Dr. E. Birch-Hirschfeld vom Institut für Virologie der FSU Jena synthetisiert.

Reagenzien	Menge je Probe
Aqua dest.	6,875 µl
10 x PCR Puffer (Qiagen)	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM; Qiagen)	2 µl
dNTPs (10µM each; Promega)	0,5 µl
Primer-Mix (20 µM each)	0,5 µl
SYBR Green I (10 000 x; Sigma)	2,5 µl
HotStarTaq (5 U/ µl; Qiagen)	0,125 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>15 µl</b>

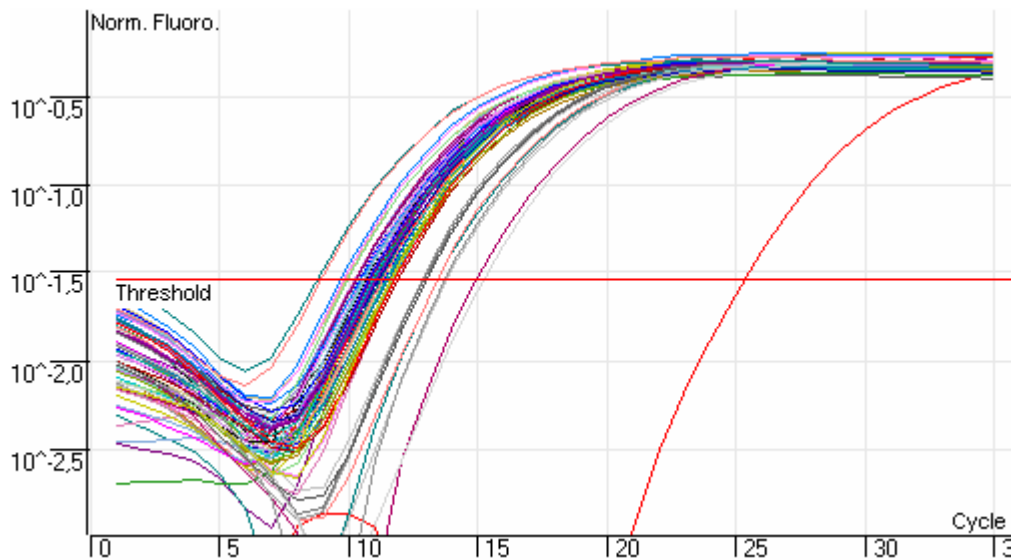
Alle zu beurteilenden Proben werden jeweils zusammen mit den entsprechenden Standards in einer Reaktion untersucht. Folgendes PCR-Programm wird verwendet:

1. 95°C für 15 min
2. 95 °C für 30 sek
3. 55 °C für 30 sek
4. 72 °C für 30 sek
5. 35 Wiederholungen von Schritt 2-4
6. 72 °C für 7 min
7. 4°C ∞

Bei SYBR Green I handelt es sich um einen unspezifisch interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, das heißt, SYBR Green I bindet nicht nur an die zu amplifizierende Ziel-DNA, sondern auch an Artefakte wie z. B. Primerdimere. Deshalb wurde im Anschluß an jede Real Time PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, welche dazu diente, durch schrittweisen Temperaturanstieg und gleichzeitiger Messung der damit verbundenen Fluoreszenzabnahme solche Artefakte zu identifizieren. Artefakte schmelzen aufgrund ihrer geringen Größe schon bei niedrigeren Temperaturen als spezifische Produkte, die größer sind. So konnten die Ergebnisse mit einheitlicher Schmelzkurve identifiziert und ausgewertet werden.

Nach Beendigung der PCR wurden die Produkte noch auf einem Agarosegel elektrophoretisch bezüglich Größe, Integrität und Bandenspezifität überprüft. Die Daten der Fluoreszenzsignale wurden mit der Rotorgene 2000 Software version 4.2 ausgewertet. Die Daten wurden als Ct-Wert (threshold cycle, Schwellenwertzyklus) angegeben, wobei der

threshold die Trennlinie zur Unterscheidung zwischen signifikanter Zunahme der Fluoreszenz und der Hintergrundfluoreszenz darstellt und der Ct-Wert die Zyklenzahl angibt, bei der das Fluoreszenzsignal erstmals den Schwellenwert erreicht. Ab dieser Phase verläuft die Amplifikation exponentiell. Je eher eine Probe diese Schwelle erreicht, desto höher ist die initiale Kopienzahl. Die gewonnenen Daten wurden zur relativen Quantifizierung mit  $\beta$ -Aktin abgeglichen. Die Ergebnisse der Proben der Tage 1, 3, 7, 14 und 21 wurden mit dem Expressionsprofil von Tag 0 als Kontrollprobe verglichen, wobei Tag 0 auf 1,0 gesetzt wurde.



**Abb. 8: Visualisierung der Rohdaten für  $\beta$ -Aktin einer Probe und die Standards während eines Experiments mit dem Rotorgene 2000 von Corbett Research**

## 2.2.4 Beurteilung der Arthritis

### 2.2.4.1 Histologie

Die rechten und linken Kniegelenke wurden nach der Präparation für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur in 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Nach Entkalkung der Kniegelenke mit EDTA wurde dem Gewebe über eine aufsteigende Alkoholreihe das Wasser entzogen. Nach dem Überführen in Xylol wurden die Gelenke in Paraffin eingebettet. Von jedem Gelenk wurden mindestens drei 4  $\mu$ m dicke frontale Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgezogen und über Xylol und eine absteigende Alkoholreihe entparaffinisiert. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Damit können sowohl die Kerne (blau) als auch das Zytoplasma (rosa) dargestellt werden. Zur Beurteilung der Knorpeldestruktion wurde eine Safranin-O-Färbung angefertigt, bei welchem sich das Proteoglykan rot darstellt. Um die Schwere der akuten und chronischen Entzündung bzw.

das Ausmass der Knorpel- und Knochendestruktion zu beurteilen wurden die Präparate von zwei unabhängigen Experten nach dem in Abb. 9 aufgelisteten Bewertungsschema begutachtet und die einzelnen Punktwerte zum Schweregrad addiert.

---

### Akute Inflammation

---

#### Exsudat

- |   |                                |
|---|--------------------------------|
| 1 | einzelne infiltrierende Zellen |
| 2 | ungleichmäßige Infiltrate      |
| 3 | massive Infiltration           |

#### Granulozytäre Infiltration

- |   |  |
|---|--|
| 1 | einzelne infiltrierende Zellen               |
| 2 | kleinherdige oder diffus mäßige Infiltration |
| 3 | mittelgradige bis dichte Infiltration        |
- +1 wenn Fibrin deutlich nachweisbar  
+1 wenn periartikuläres Gewebe mit betroffen

---

### Chronische Inflammation

---

#### Hyperplasie

- |   |   |
|---|---|
| 1 | gering, keine Aktivierung von Deckzellen      |
| 2 | ungleichmäßig, mit Aktivierung von Deckzellen |
| 3 | massiv  |

#### Mononukleäres Infiltrat

- |     |                                 |
|-----|---------------------------------|
| 0,5 | herdförmig (hf.) schütter       |
| 1   | überwiegend schütter            |
| 1,5 | überwiegend schütter, hf. mäßig |
| 2   | überwiegend mäßig               |
| 2,5 | überwiegend mäßig, hf. dicht    |
| 3   | überwiegend dicht               |

#### Periartikuläre Strukturen (Fibrose/Infiltration)

- |   |   |
|---|---|
| 1 | geringe Fibrose/Infiltration                            |
| 2 | mäßige Fibrose/Infiltration                             |
| 3 | stark fibrös verbreitert/starke Infiltration, Granulose |

---

### Destruktion/ Pannus

---

- |   |   |
|---|---|
| 1 | einzelne Nekrosen oder minimale Defekte                         |
| 2 | kleinere Defekte, flächenhafte Nekrosen                         |
| 3 | größere Defekte (10-50% einer Gelenkfläche oder mehrere kleine) |
| 4 | massiver Defekt (>50% einer Gelenkfläche)                       |

**Abb. 9: Lichtmikroskopische Beurteilung der Histologien**

#### 2.2.4.2 Immunhistochemie

Die rechten Kniegelenke wurden nach der Entnahme für 6 Stunden in komplettem DMEM versetzt mit 2 mM Monensin bei 37°C inkubiert und anschließend für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur in 4%igem Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach Entkalkung der Kniegelenke in 20%igem EDTA wurde über eine aufsteigende Alkoholreihe dem Gewebe das Wasser entzogen. Anschließend wurde das Gelenk in Paraffin eingebettet. Von jedem Gelenk wurde 1 frontaler Schnitt angefertigt und auf einen Objektträger übertragen. Anschließend wurde der Schnitt für 20 min in Xylol entparaffinisiert und in einer aufsteigenden Acetonreihe 3 x 5 min rehydriert. Danach begann die Immunhistochemie mit dreimaligem Waschen der Schnitte in 0,05 M TRIS-gepufferter Kochsalzlösung und Umrahmung der Schnitte auf dem Objektträger mit einem Fettstift (DakoCytomation, Hamburg), so dass sich die zur Anwendung kommenden Flüssigkeiten besser auf den Schnitten halten konnten. Die Immunhistochemie für MMP-3 wurde nach Protokoll mit dem UltraVision-Mouse-Detection-System-Anti-Mouse, HRP/ DAB-Kit durchgeführt. Der Kit wurde vom Hersteller für den Einsatz von Maus-AK auf Mausgewebe optimiert. Es wurde außerdem eine Isotypkontrolle (Normal-Maus-IgG anstelle des primären AK) und eine Negativkontrolle (weglassen des sekundären AK) mitgeführt, um die Aussagefähigkeit der Untersuchung bezüglich der Spezifität und Validität besser abschätzen zu können. Als Primär-AK dienten monoklonale AK (MMP-3, Ab-1) von Calbiochem, Darmstadt, die in einer Verdünnung von 1:25 zur Anwendung kamen. Auch die Isotypkontrolle (Normal-Maus-IgG) wird in einer Verdünnung von 1:25 verwendet. Nach Beendigung des Protokolls wurden die Schnitte für 20 Sekunden in Hämatoxylin zur Lokalisation der Kerne gefärbt, mit Leitungswasser abgewaschen und nach 15 min mit bei 60°C erwärmter Glycerin-Gelatine abgedeckt.

## 2.2.5 Statistik

Die Expressionsprofile der verschiedenen Gruppen wurden mit dem nichtparametrischen U-Test von MANN und WHITNEY auf signifikante Unterschiede überprüft. Die Definition der p-Werte ist in Tabelle 12 aufgeführt. Aufgrund des geringen Stichprobenumfanges wurde zusätzlich die  $\alpha$  - Adjustierung nach Holm durchgeführt, d. h. dass nach Prüfung der Parameter mit dem MANN - WHITNEY - Test ein nachfolgender Abgleich der p - Werte auf  $p = 0,05 / n$  durchgeführt wurde.

**Tab. 12: Signifikanzen.** \* bedeutet gesteigerte Expression, # steht für verminderte Expression.

Signifikanz	p	Symbol	
nicht signifikant	$p > 0,1$		
eingeschränkt signifikant	$p \leq 0,1$	(*)	(#)
signifikant	$p \leq 0,05$	*	#
sehr signifikant	$p \leq 0,01$	**	##
extrem signifikant	$p \leq 0,001$	***	###

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 cDNA -Array-Entwicklung

Es gibt viele Tiermodelle der rheumatoiden Arthritis, bei welchen Proteinase und ihre Wirkung eine große Rolle spielen. Diese Proteinasemuster in ihrer Gesamtheit zu untersuchen ist ein Anspruch, welchem cDNA-Arrays gerecht werden können. Schon in vielen Tiermodellen wurden Untersuchungen mittels cDNA Arrays eingesetzt.

**Tab. 13: Bezüglich des Genexpressionsprofils untersuchte Arthritismodelle.** SWCIA=Streptococcal Wall-induced Arthritis, CIA=Collagen-induced Arthritis, PIA=Pristan-induced Arthritis, PGIA=Proteoglycan-induced Arthritis, AA=Adjuvant-induced Arthritis, AIA=Antigen-induced Arthritis.

Arthritismodell	Tiermodell	mRNA aus	Genexpressionsanalyse durch	Kontrolle auf mRNA- / Proteinebene
SWCIA	Lewis-Ratten	Knöchel	Rioja et al, 2004	Real Time PCR - TaqMan®/-
CIA	DBA1/J-Mäuse + CIA-resistente FVB/NJ-Mäuse	Pfote	Gierer et al, 2005	-/-
PIA	PIA-anfällige DA-Ratten + PIA-resistente E3-Ratten	inguinale LK	Wester et al, 2003	Custom-made oligomer glass arrays, Real Time PCR/ FACS, ELISA
PGIA	SCID-Mäuse	Pfote	Adarichev et al, 2004	-/-
AA	Lewis-Ratten	Knöchel	Shahrara et al, 2003	-/Westernblot, Immunhistochemie
AIA	C57/ Bl6-Mäuse	Kniegelenk	Schurigt et al, 2005	Real Time PCR/ Zymographie, ELISA, Immunhistochemie

Oligonukleotid-Arrays können durch eine bestimmte Anordnung von Oligomeren bzw. Algorithmen zur Kalkulation derselben oft zu unrealistischen falsch-positiven Werten führen (Wester et al, 2003). Custom-made Arrays ermöglichen meist ein naturgetreueres Bild der Situation, da die Primersuche, Markierungs- und Detektionsprozeduren unterschiedlich und manchmal spezifisch auf die Untersuchung abgestimmt sind. Mit der Entwicklung dieses Arrays wurde eine Möglichkeit geschaffen spezielle Gensequenzen im Hinblick auf die Untersuchung der Proteinase-Expression arthritischer Fibroblasten im Modell der AIA zu untersuchen, welche auch in der humanen RA eine besondere Rolle spielen könnten. Einer Literaturrecherche zum Auffinden der vollständigen Gensequenz der relevanten Proteinase und ihrer Inhibitoren bzw. die Identifikation und Lokalisierung dieser Proteinase in den verschiedenen Organen schloß sich eine Primersuche an. Dazu wurde die Software DNASTAR

benutzt. Mit Blast-search ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) erfolgte eine Überprüfung der Spezifität der Sequenzen, um Kreuzhybridisierungen zu minimieren.

**Tab. 14: Primer zur Herstellung der cDNA für Mikroarrays.** Die Primer wurden von Gibco Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert.

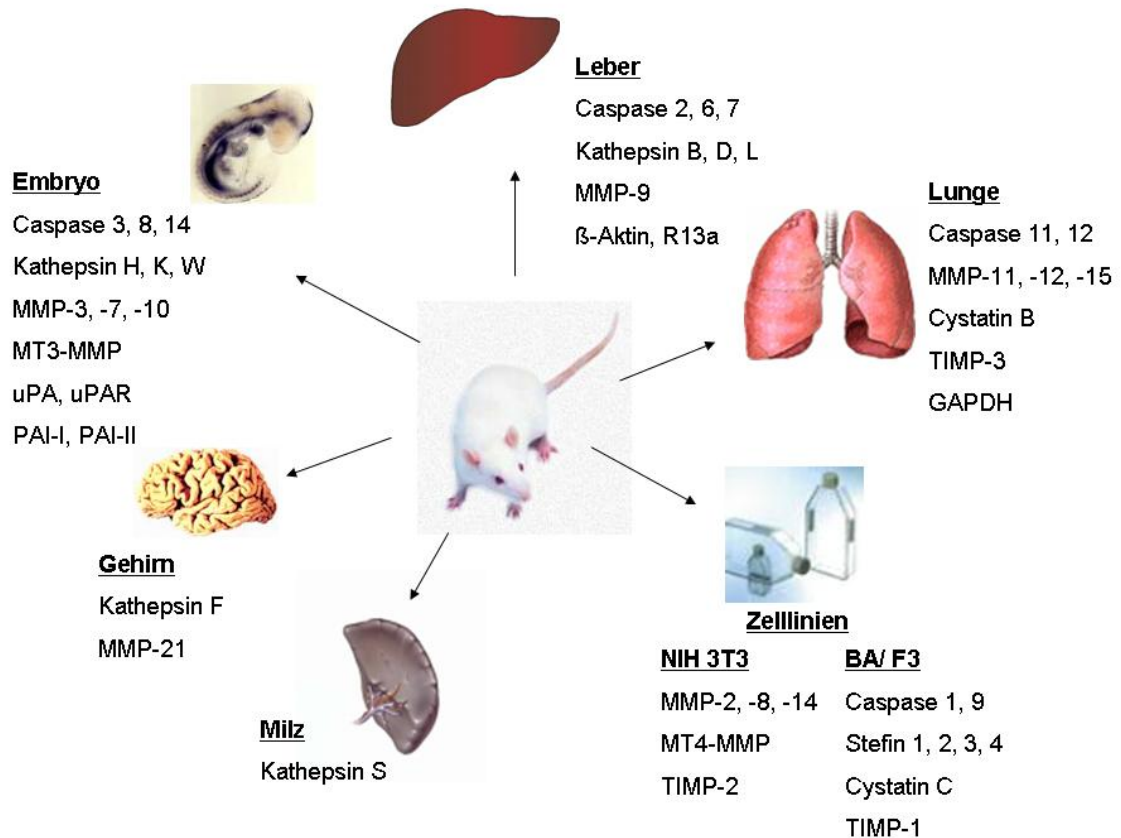
Name	Sequenz	Größe
M Caspase 1.1	5'-CTCgTACACgTCTTgCCCTCATTA -3'	24mer
M Caspase 1.2	5'-TTggCTTCTTATTggCACgATTCT -3'	24mer
M Caspase 2.1	5'-AAgCAgCTCCgCCTATCCACAg-3'	22mer
M Caspase 2.2	5'-CTCTTTgCCAgCATCACTCTCCTC-3'	24mer
M Caspase 3.1	5'-ggACgCAgCCAACCTCAgA-3'	19mer
M Caspase 3.2	5'-ATCCCCTATTCCACCCAACCTTTAT-3'	24mer
M Caspase 6.1	5'-gAgAggCggggCACCAAC-3'	18mer
M Caspase 6.2	5'-TCACAAAaggggAggCAAAGTAGT-3'	24mer
M Caspase 7.1	5'-ggggCCATCAACgACATT-3'	19mer
M Caspase 7.2	5'-CTgCCCTAAgCCACTgAgAACAA-3'	23mer
M Caspase 8.1	5'-TgAgACAgTgAgCACAgCCAgAgA-3'	24mer
M Caspase 8.2	5'-AAgCAAAACAAAACATACATACAA-3'	24mer
M Caspase 9.1	5'-AggCCggTggACATTggTTCTg-3'	22mer
M Caspase 9.2	5'-CAAaggATgTCACTgggggTAgg-3'	22mer
M Caspase 11.1	5'-AgCAgAgggCATggAgTCAgAgAT-3'	24mer
M Caspase 11.2	5'-TCAgTTgCCAggAAAgAggTAGAA-3'	24mer
M Caspase 12.1	5'-ggCggCCAggAggACACA-3'	18mer
M Caspase 12.2	5'-gTTgCAgATgATgAgAgCCAgACg-3'	24mer
M Caspase 14.1	5'-CCTggCCCTgACgCTgTgT-3'	19mer
M Caspase 14.2	5'-gCTggCTTgCCCTgAAACTgA-3'	21mer
M Cathepsin B.1	5'-CTTCCTTCCACCCgCTgTCg-3'	20mer
M Cathepsin B.2	5'-TCCACTgggCCATTTTTgTAGATT-3'	24mer
M Cathepsin D.1	5'-TggTggggCCTgTggAAgAg-3'	20mer
M Cathepsin D.2	5'-AAgggCggCAggACAAGACA-3'	20mer
M Cathepsin F.1	5'-gCCCACTgCCTgAgACgAAgAAAA-3'	24mer
M Cathepsin F.2	5'-gCCCTggTAGCCgTAGTCATCCTC-3'	24mer
M Cathepsin H.1	5'-TggggCCTggCTgCTgAg-3'	18mer
M Cathepsin H.2	5'-AggCCTggCTggggAgACC-3'	19mer
M Cathepsin K.1	5'-gTgTggTTCCTgTTgggCTTTCA-3'	23mer
M Cathepsin K.2	5'-CCgCAggCgTTgTTCTTATTCC-3'	22mer
M Cathepsin L.1	5'-CAggCAggTggTgAATggCTATC-3'	23mer
M Cathepsin L.2	5'-TgTCCCggTCTTTggCTATTTTg-3'	23mer
M Cathepsin S.1	5'-CAgCACCTACATgggAACTC-3'	20mer
M Cathepsin S.3	5'-Agg TCA TAC TCT AAT Cgg ACA-3'	21mer



Name	Sequenz	Größe
M Cathepsin W.1	5'-CggCCACTggAgCTgAAggAAg-3'	22mer
M Cathepsin W.2	5'-CCAAAgCCCACCAgCAAgACAgA-3'	23mer
M Cathepsin Z.1	5'-ggC CCT CCA TCC TgC TgT C-3'	19mer
M Cathepsin Z.2	5'-TAA TTA ATC ACC CCT CCC TgT CAT-3'	24mer
M Cystatin B.1	5'-ACACCCAggCCTAAACAAGAgAAA-3'	24mer
M Cystatin B.2	5'-TggCCCCACTgATAAAgAACAAC-3'	23mer
M Cystatin C.1	5'-gCggCgACCCCAAACAAG-3'	19mer
M Cystatin C.2	5'-AgAgTggAgCCAggggACAgC-3'	21mer
M MMP 2.1	5'-gTACTggCCCCACACCgACAT-3'	21mer
M MMP 2.2	5'-CCgCCAaggCTgCTTCACAT-3'	19mer
M MMP 3.1	5'-TCgggTTggAgATgACAgg-3'	19mer
M MMP 3.2	5'-AgAgATggAAACgggACAAGT-3'	21mer
M MMP 7.1	5'-CAgAATACTACTAATgCCAAACA-3'	24mer
M MMP 7.2	5'-ATgCCAgtgAgggATgC-3'	18mer
M MMP 8.1	5'-TTACAgggAgAAgCAgACATCAAC-3'	24mer
M MMP 8.2	5'-gCCgggCCAgAACAgAg-3'	17mer
M MMP 9.1	5'-AgggCgCTCTgCATTCTTCAA-3'	22mer
M MMP 9.2	5'-AgggCACTgCAggAggTCgTAg-3'	22mer
M MMP 10.1	5'-CTTTgAAggTCTgggAggAggTgA-3'	24mer
M MMP 10.2	5'-gAAgAgTgggCCAAAATgCTgATA-3'	24mer
M MMP 11.1	5'-ACCCCAgAACCCAgCgAgTg-3'	20mer
M MMP 11.2	5'-gAAgAgggCCCAgAAAgAAATg-3'	23mer
M MMP 12.1	5'-CAgTgCCCCAgAggTCAAgATg-3'	22mer
M MMP 12.2	5'-TCAAggATgggggTTTCACTgg-3'	22mer
M MMP 14.1	5'-ATgCCCCCTCAACCCAgAACTAC-3'	23mer
M MMP 14.2	5'-TgCCCTCCTCATCCACCTCAAT-3'	22mer
M MMP 15.1	5'-TgggCCATggTACAgCgTCTAA-3'	22mer
M MMP 15.2	5'-ACCAgggCCggggAAATAAg-3'	20mer
M MMP 21.1	5'-TTgAgCCggAggAggAgAAATAAg-3'	24mer
M MMP 21.2	5'-CTgCggACCgggAgTgTAgg-3'	20mer
M MT3MMP1	5'-ggAggCgACACCCATTTTgATT-3'	22mer
M MT3MMP2	5'-AgATggTgATgggCTTggggTAA-3'	23mer
M MT4MMP1	5'-gCCgCCCCAAgCTCCATCAT-3'	20mer
M MT4MMP2	5'-gTACCCgggggCTgCTTCC-3'	19mer
M TIMP 1.1	5'-ggTgTTCCCTgTTTATC-3'	18mer
M TIMP 1.2	5'-TAgTTCTTTATTTACCATCT-3'	21mer
M TIMP 2.1	5'-ggCCCCCTCTTCAGAgTgT-3'	20mer
M TIMP 2.2	5'-AAAATAggggAgggggCAgAAT-3'	22mer

Name	Sequenz	Größe
M TIMP 3.1	5'-gTggCCTCAAgtAgAAgTCAACA-3'	24mer
M TIMP 3.2	5'-gCggggCCAggAAggTAT-3'	18mer
M Stefin 1.1	5'-gATgAgTCTTggAggTgTT-3'	19mer
M Stefin 1.2	5'-AgTTgAggAgTATTTCTTTATTC-3'	23mer
M Stefin 2.1	5'-AATAATTggAggTTTgTCAgAgg-3'	23mer
M Stefin 2.2	5'-gggTTAggggATCAggTCAAgTT-3'	23mer
M Stefin 3.1	5'-TgCCCATCAATgAgTCAAgAAAAC-3'	24mer
M Stefin 3.2	5'-TACAaggAgAAgAATCAggTCACT-3'	24mer
M Stefin 4.1	5'-gCCACAgCagAAgTCCA-3'	18mer
M Stefin 4.2	5'-TTAgAAgTAggTCAgCTCATCATC-3'	24mer
M UPA 1	5'-gCCTAggCCTggggAAACACA-3'	21mer
M UPA 2	5'-TtgggggCAggCagATggT-3'	19mer
M UPAR 1	5'-gCCTgCAATgCCgCTATCCTA-3'	21mer
M UPAR 2	5'-TgCgCACACCCCTTTTATCAgA-3'	22mer
M PAI 1.1	5'-ACgCCTggTgCTggTgAAT-3'	19mer
M PAI 1.2	5'-ATgCgggCTgAGATgACAAA-3'	20mer
M PAI 2.1	5'-gTgAAATCCCAAACCTgCTACCC-3'	24mer
M PAI 2.2	5'-CACgCTggCTTgATggAACAC-3'	21mer
M R13a 1	5'-ACTAgCCCCCTTTTggACCTCAC-3'	23mer
M R13a 2	5'-gACgCCCTCACTCgCTTCTATC-3'	22mer
M GAPDH 1	5'-gTgAggCCggTgCTgAgTATgTC-3'	23mer
M GAPDH 2	5'-gTgTTgggggCCgAgTTgg-3'	19mer
M beta-actin 1	5'-ACCACCACAgCTgAgAgggAAATC-3'	24mer
M beta-actin 2	5'-CAgCACTgTgTTggCATAgAggTC-3'	24mer

Anschließend wurde aus dem Gewebe von zwei weiblichen Mäusen des Stammes Balb/c und murinen Embryonen sowie den Zelllinien NIH 3T3 und BA/ F3 mRNA isoliert und nach reverser Transkription und einer anschließenden PCR mit den spezifischen Primern die vorhandene cDNA amplifiziert. Einer erfolgreichen Amplifikation schloß sich eine Klonierung und Reinigung des Produktes an. Nach einer Sequenzierung wurde das Produkt in einer bestimmten Konzentration auf einen Nylon-Filter aufgetragen. Dieser Schritt erfolgte in Kooperation mit der AG Klein im Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilian-Universität München unter der Leitung von PD Dr. Chr. Klein. Nun stand ein Filterarray zur Analyse von Expressionsprofilen zur Verfügung.



**Abb. 10: Herkunft der für den Array verwendeten cDNA.**

### 3.2 cDNA-Array-Analysen

#### 3.2.1 cDNA-Array-Analysen von direkt (*in vivo*) isolierter RNA

Zur Analyse des Expressionsmusters von Proteinasen und Proteinaseinhibitoren während der Entwicklung einer Arthritis wurde die RNA aus den ipsilateralen arthritischen Kniegelenken von zwei Mäusen mit AIA zur Kontrolle vor der Induktion der Arthritis am Tag 0, in der akuten Phase am Tag 3 und im Übergang zur chronischen Phase am Tag 14 isoliert, mit Digoxigenin markiert und hybridisiert. Anschließend erfolgte die Exposition der Arrays auf einem Röntgenfilm zu unterschiedlichen Zeiten, um einerseits stark exprimierte Gene vor dem Zeitpunkt der Röntgenfilmsättigung aufzunehmen und andererseits, um auch von schwach, aber differentiell exprimierten Genen noch ein Signal zu erhalten. Die Vermessung erfolgte anschließend mit der Software Scion Image.

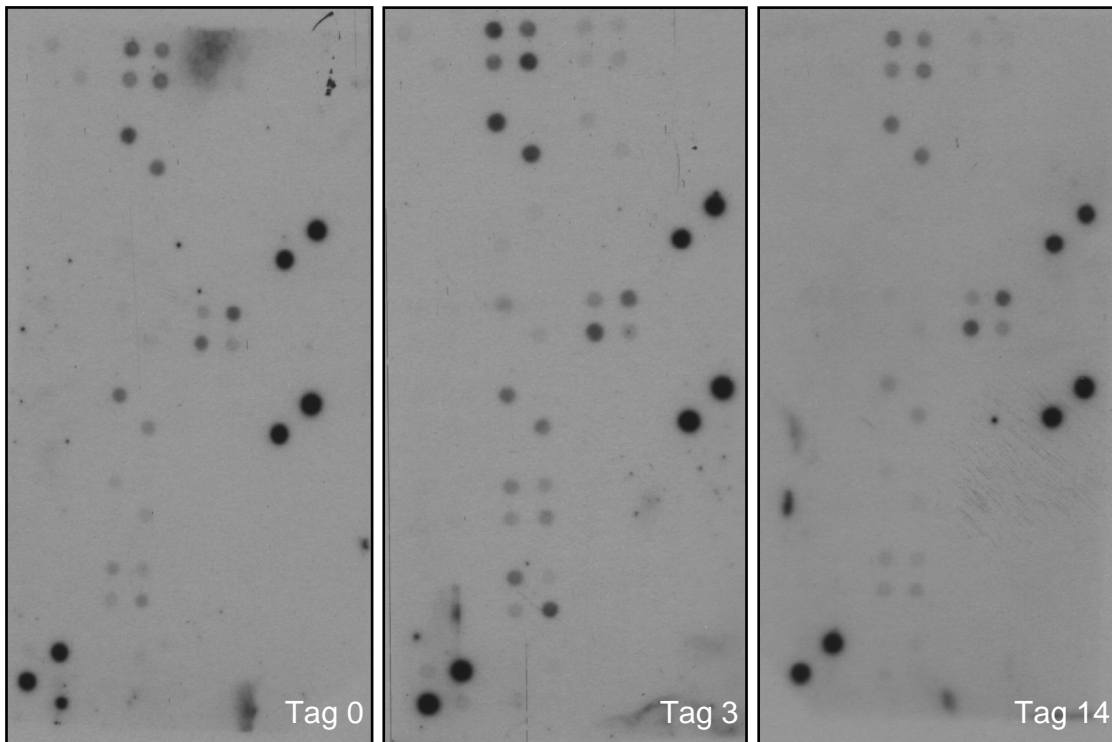
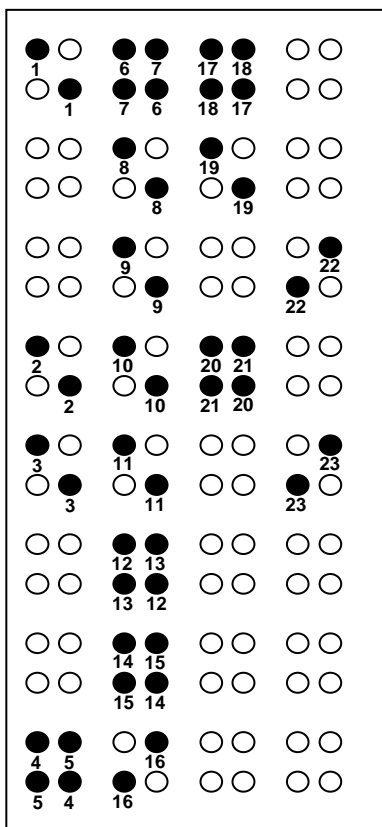


Abb. 11: Darstellung der cDNA-Arrays, erste Versuchsreihe der *in vivo*-Untersuchungen, Expositionszeit 30 min.

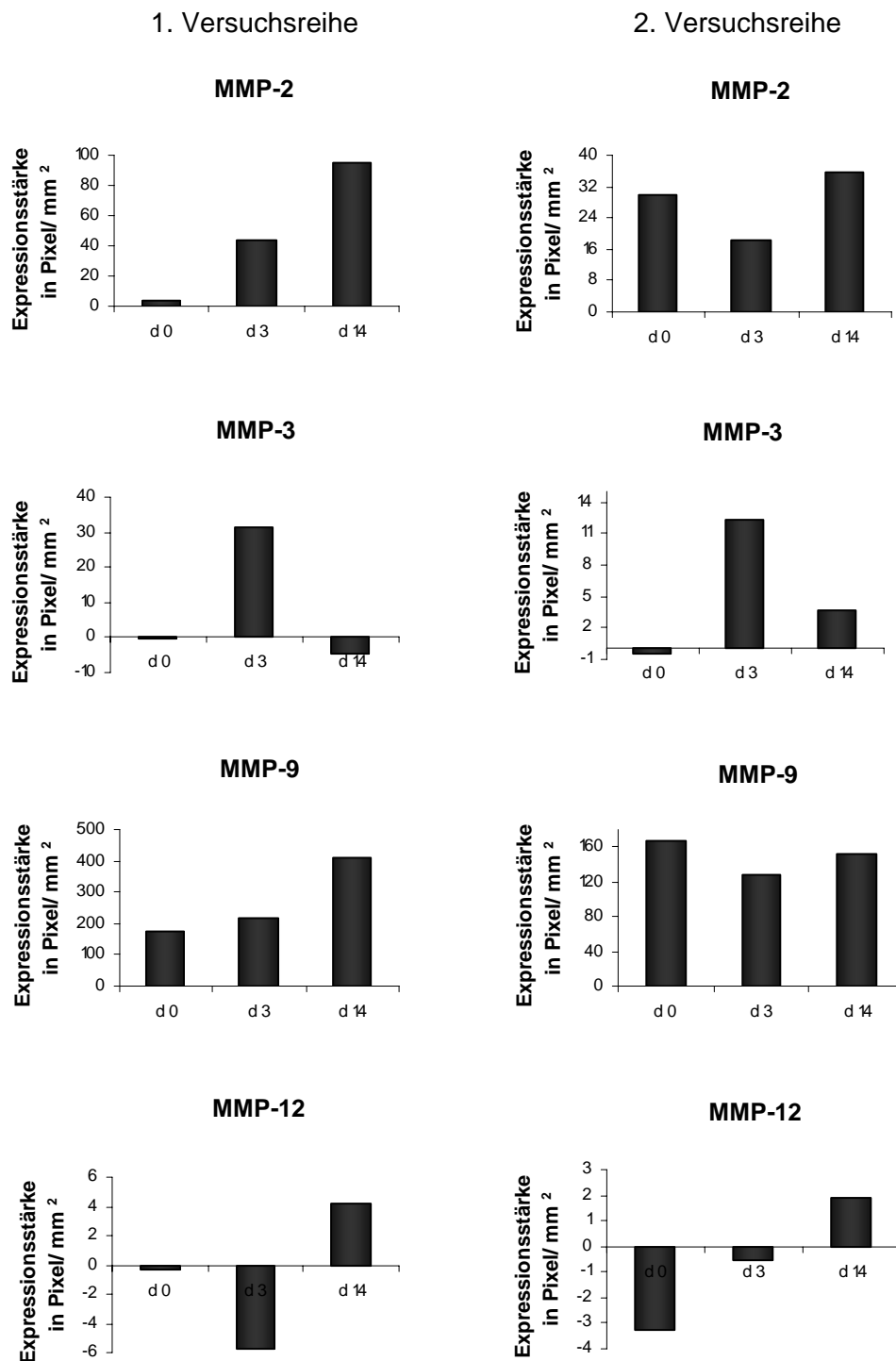


- |                 |                    |
|-----------------|--------------------|
| 1) Caspase 1    | 13) TIMP-1         |
| 2) Caspase 6    | 14) Kathepsin S    |
| 3) Caspase 7    | 15) TIMP-2         |
| 4) Caspase 11   | 16) TIMP-3         |
| 5) Cystatin C   | 17) MMP-2          |
| 6) Kathepsin B  | 18) MMP-14         |
| 7) Kathepsin Z  | 19) MMP-3          |
| 8) Kathepsin D  | 20) MMP-8          |
| 9) Kathepsin F  | 21) MMP-9          |
| 10) Kathepsin H | 22) $\beta$ -Aktin |
| 11) Kathepsin K | 23) GAPDH          |
| 12) Kathepsin L |                    |

Abb. 12: Legende zu Abb. 11 zur Identifizierung der sichtbaren Spots der ersten *in vivo*-Versuchsreihe

Nach densitometrischer Ausmessung der Intensität der einzelnen Spots zeigte sich schon visuell eine Hochregulation von MMP-3 und TIMP-1, welches dann auch durch die Berechnung und Abgleich gegen das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin bestätigt werden konnte. Mit der Analyse der cDNA-Arrays konnte ein erster Überblick über die Expressionsmuster von Kathepsinen, Matrixmetalloproteinasen, Caspasen und ihren Inhibitoren gewonnen werden. Es konnten zahlreiche Proteinase identifiziert werden, die ein interessantes Expressionsmuster aufweisen, welche durchaus mit den Prozessen, die bei einer Arthritis ablaufen in Zusammenhang gebracht werden konnten. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Aussagefähigkeit der entwickelten cDNA-Arrays, ihrer Vor- und Nachteile bzw. mit Methoden zur weiterführenden Untersuchung und Erklärung der gewonnenen Ergebnisse. Es wurden jeweils zwei Versuchsreihen durchgeführt, d.h., es wurde die RNA von 2 Tieren am Tag 0, Tag 3 und Tag 14 der Arthritis der Analyse mit cDNA-Arrays unterzogen. Damit soll dem Kriterium der Reproduzierbarkeit der Methode Rechnung getragen werden. Allerdings muß berücksichtigt werden, das jede mRNA aus dem Gewebe eines Tieres gewonnen wurde, d. h. nicht aus einer homogenen Zellpopulation. Die zelluläre Zusammensetzung beider Gewebeproben kann in gewissen Grenzen unterschiedlich und Ursache für die Abweichung der beiden Proben untereinander sein.

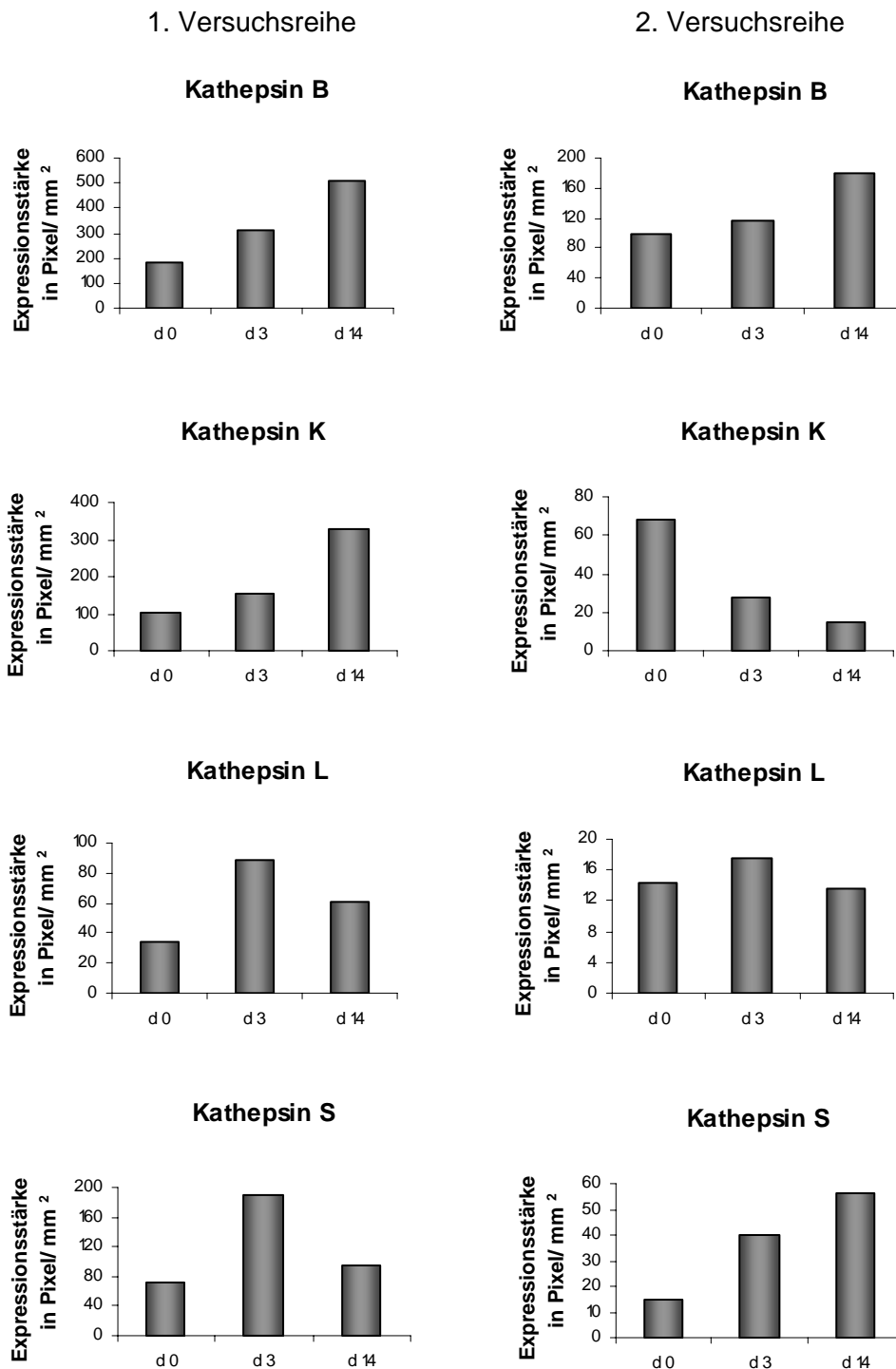
## Auswertung der cDNA-Arrays – Vergleich von zwei Screeningsets



**Abb. 13:** Darstellung der Ergebnisse für MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP 12 der cDNA-Array-Analysen im Vergleich. Es wird ein Vergleich von zwei Versuchsreihen nach Messung der Intensität von jeweils zwei Spots  $[(Density_{Spot} * Area_{Spot}) - (Density_{Background} * Area_{Spot})]$  gezeigt und ist dargestellt als Mittelwerte in Pixel/ mm<sup>2</sup>. Eine stat. Auswertung ist aufgrund der Tieranzahl (n=1) nicht möglich.

Nach Auswertung der beiden Versuchsreihen kann festgehalten werden, dass die Arrays hybridisierbar sind. MMP-3 kann am Tag 0 nicht nachgewiesen werden, ist am Tag 3 nachweisbar und am Tag 14 wieder herunterreguliert.

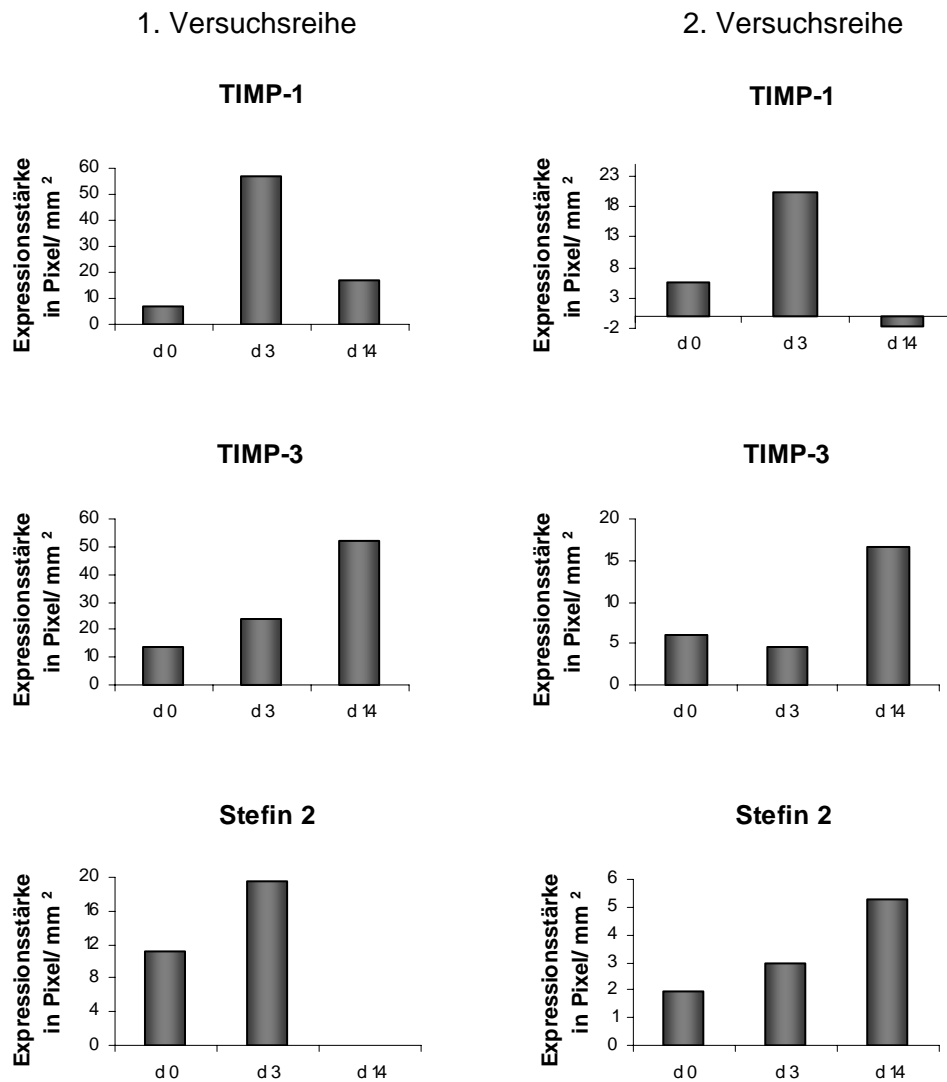
Die anderen untersuchten MMPs zeigen kein einheitliches Bild. Über MMP-2 als auch MMP-9 kann keine genaue Angabe über eine Zu- oder Abnahme der Signalstärken gemacht werden. MMP-12 zeigt eine Zunahme der Signalstärke in der chronischen Phase der AIA.



**Abb. 14: Darstellung der Ergebnisse für Kathepsin B, K, L und S der cDNA-Array-Analysen im Vergleich.** Es wird ein Vergleich von zwei Versuchsreihen nach Messung der Intensität von jeweils zwei Spots  $[(Density_{Spot} * Area_{Spot}) - (Density_{Background} * Area_{Spot})]$  gezeigt und ist dargestellt als Mittelwerte in  $Pixel/mm^2$ . Eine stat. Auswertung ist aufgrund der Tieranzahl ( $n=1$ ) nicht möglich.



Die untersuchten Kathepsine zeigen im allgemeinen ein gleiches Bild. Sowohl Kathepsin B, Kathepsin L und Kathepsin S zeigen am Tag 3 nach Arthritisinduktion eine Zunahme der Signalstärke. Beim Übergang in die chronische Phase der AIA zeigt nur Kathepsin B eine weitere Zunahme der Signalstärke, während Kathepsin L wieder herunterreguliert wird und bei Kathepsin S keine sicheren Angaben gemacht werden können. Das gleiche gilt für Kathepsin K, welches in den beiden Versuchsreihen kein einheitliches Bild zeigte.

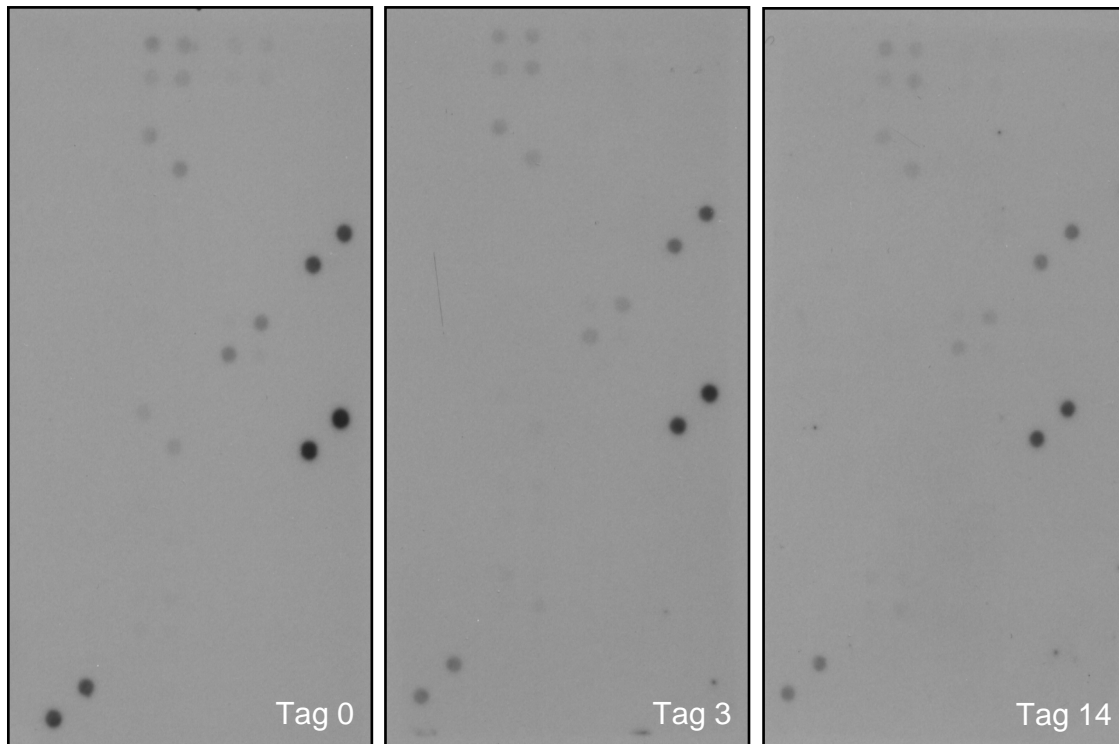


**Abb. 15: Darstellung der Ergebnisse für TIMP-1, TIMP-3 und Stefin 2 der cDNA-Array-Analysen im Vergleich.** Es wird ein Vergleich von zwei Versuchsreihen nach Messung der Intensität von jeweils zwei Spots  $[(Density_{Spot} * Area_{Spot}) - (Density_{Background} * Area_{Spot})]$  gezeigt und ist dargestellt als Mittelwerte in Pixel/mm<sup>2</sup>. Eine stat. Auswertung ist aufgrund der Tieranzahl (n=1) nicht möglich.

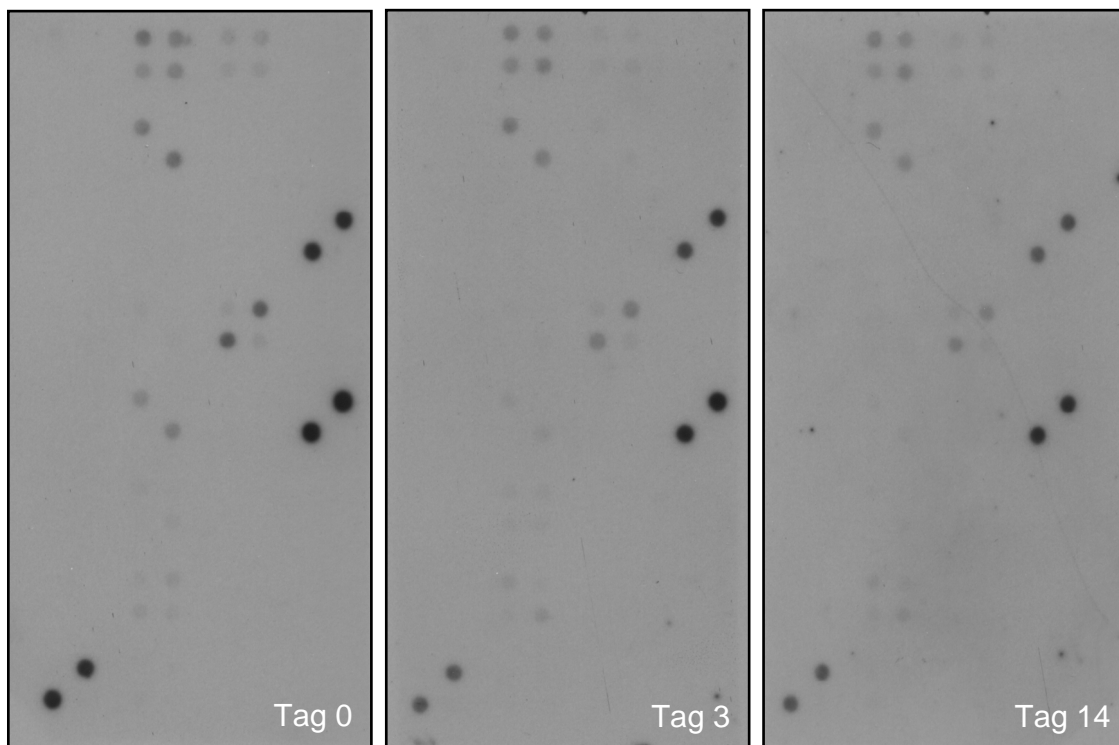
Die Untersuchung der Inhibitoren zeigt ein recht eindeutiges Bild der Zunahme der Signalstärke am Tag 3, sowie eine Abnahme der Signalstärke im weiteren Verlauf der AIA für TIMP-1. TIMP-3 spielt eventuell in der chronischen Phase der AIA eine Rolle, während zur akuten Phase keine genauen Angaben gemacht werden können. Stefin 2 wird am Tag 3 verstärkt detektiert. Am Tag 14 kann auch hier keine Aussage getroffen werden.

In Bezug auf die Untersuchungen am Modell der AIA kann man zur Analyse von Expressionsmustern mittels cDNA-Arrays sagen, dass es am aussagekräftigsten ist, wenn ein Gen zu einem bestimmten Zeitpunkt, zum Beispiel in der akuten Phase der Arthritis neu exprimiert wird. In diesem Falle ist die Reproduzierbarkeit auch sehr hoch. Man kann mit großer Wahrscheinlichkeit sagen, dass es differentiell exprimiert wird. Wird ein Gen schon vor der Arthritisinduktion stark exprimiert und erfährt im weiteren Verlauf der Arthritis eine Hochregulation, so ist das anhand der cDNA-Arrays leider nur schwer zu erkennen. Dazu kommt, dass auch Housekeeping-Gene gering differentiell exprimiert werden, so dass es bei geringen Veränderungen in der Regulation von Enzymen zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann.

**Auswertung der cDNA-Arrays – Vergleich des zweiten Screeningset bezüglich der Expositionszeit**

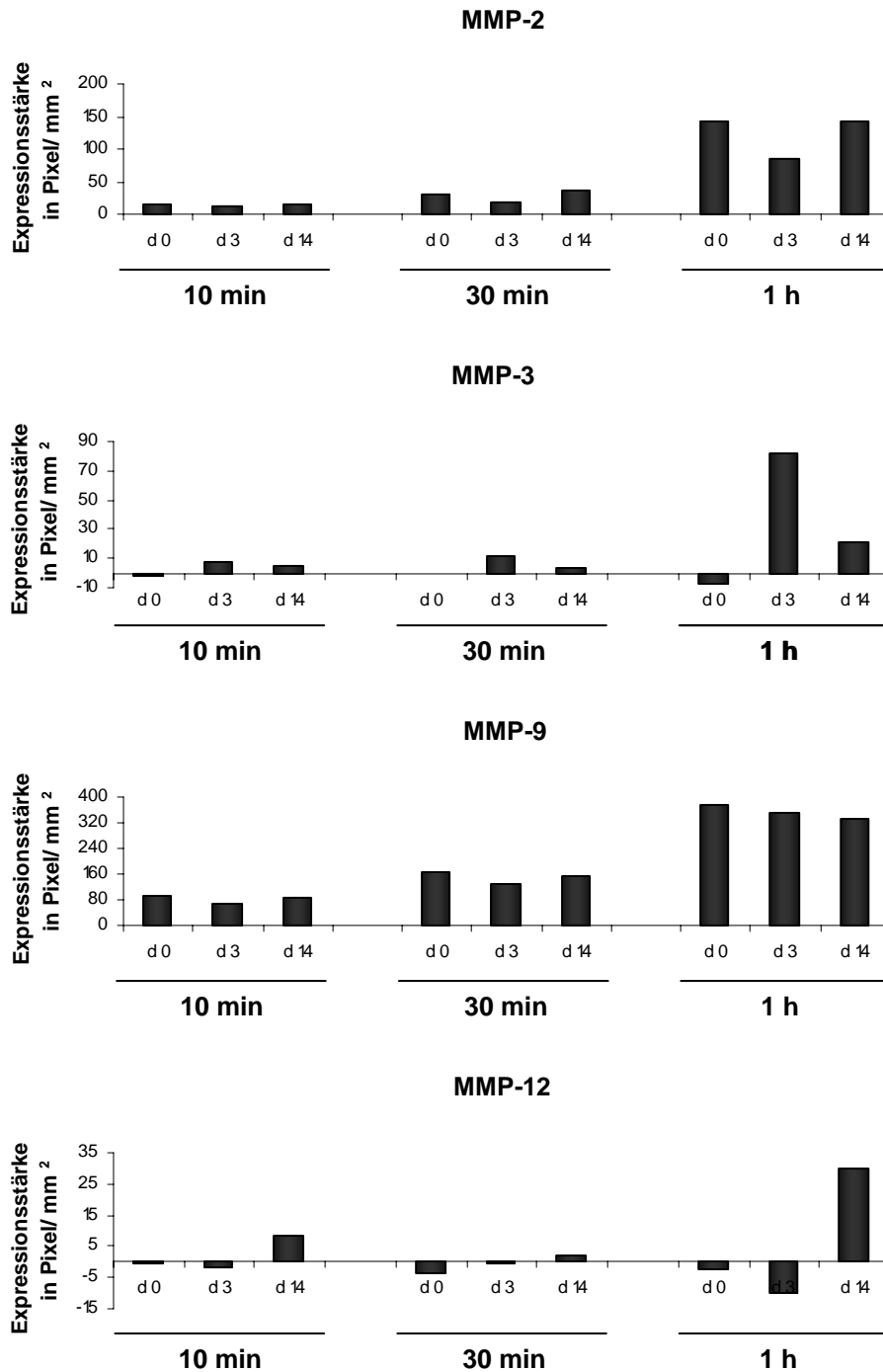


**Abb. 16:** Darstellung der cDNA-Arrays, zweite Versuchsreihe der *in vivo*-Untersuchungen, Expositionszeit 10 min.



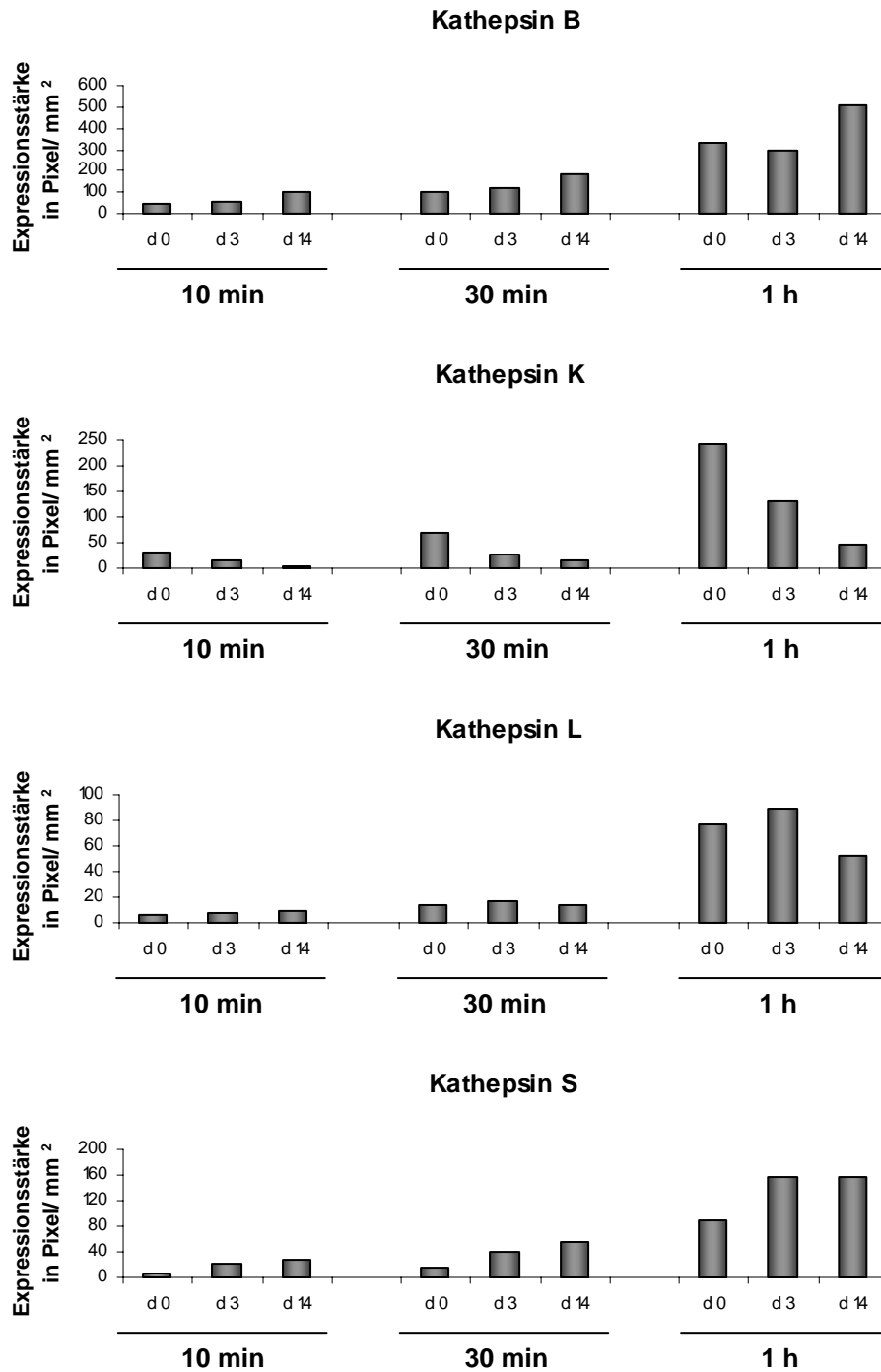
**Abb. 17:** Darstellung der cDNA-Arrays, zweite Versuchsreihe der *in vivo*-Untersuchungen, Expositionszeit 30 min.





**Abb. 20:** Darstellung der Ergebnisse für MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-12 im zeitlichen Verlauf der cDNA-Array-Analysen im Vergleich. Es wird ein Vergleich einer Versuchsreihe zu verschiedenen Zeitpunkten der Exposition des Arrays auf dem Röntgenfilm nach Messung der Intensität von jeweils zwei Spots  $[(\text{Density}_{\text{Spot}} \cdot \text{Area}_{\text{Spot}}) - (\text{Density}_{\text{Background}} \cdot \text{Area}_{\text{Spot}})]$  gezeigt und ist dargestellt als Mittelwerte in Pixel/ mm<sup>2</sup>. Eine stat. Auswertung ist aufgrund der Tieranzahl (n=1) nicht möglich.

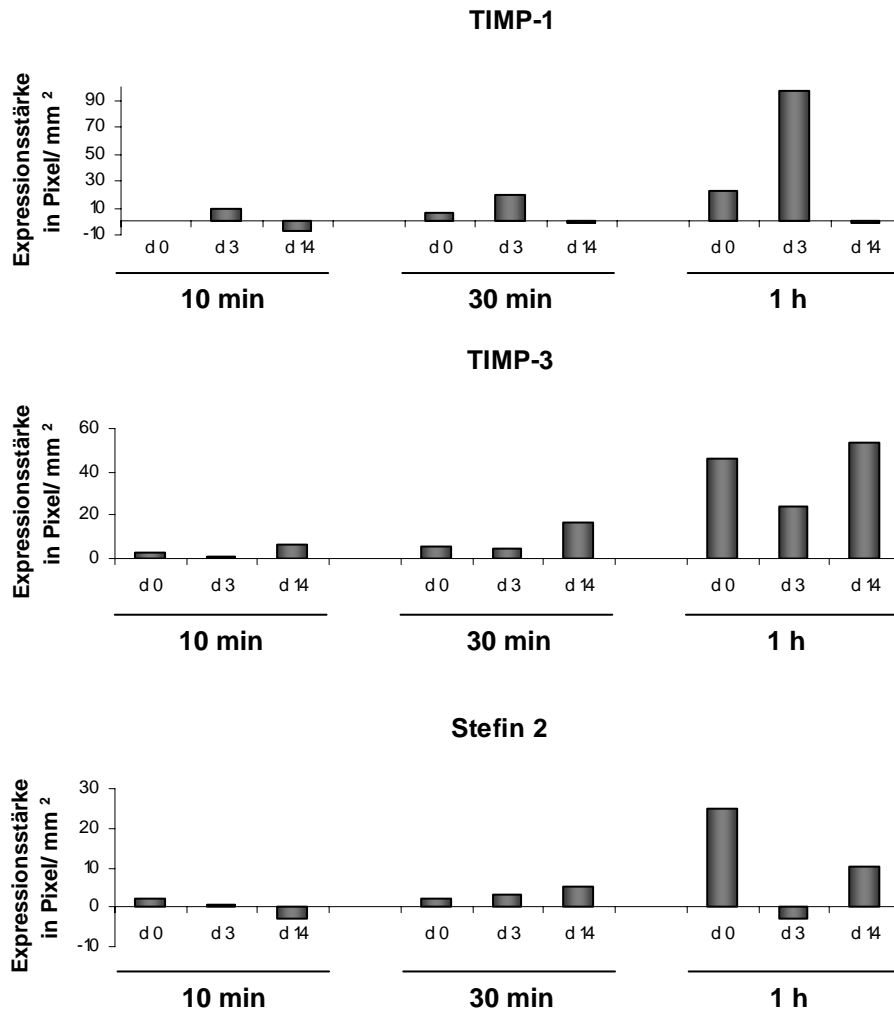
Die unterschiedlichen Expositionszeiten wirken sich im Falle der MMPs dahingehend aus, dass nach längerer Expositionszeit die Differenzen deutlicher dargestellt werden. Würde man aber das Ergebnis prozentual zum Tag 0 angeben, würde sich das Ergebnis für MMP-2 und MMP-9 nicht ändern. Wegen zu starker Hintergrundfärbung aufgrund methodischer Fehler werden für MMP-3 und MMP-12 negative Ergebnisse berechnet. Daher ist eine prozentuale Angabe der Ergebnisse nicht möglich.



**Abb. 21: Darstellung der Ergebnisse für Kathepsin B, K, L und S im zeitlichen Verlauf der cDNA-Array-Analysen im Vergleich.** Es wird ein Vergleich einer Versuchsreihe zu verschiedenen Zeitpunkten der Exposition des Arrays auf dem Röntgenfilm nach Messung der Intensität von jeweils zwei Spots  $[(\text{Density}_{\text{Spot}} \cdot \text{Area}_{\text{Spot}}) - (\text{Density}_{\text{Background}} \cdot \text{Area}_{\text{Spot}})]$  gezeigt und ist dargestellt als Mittelwerte in Pixel/ mm<sup>2</sup>. Eine stat. Auswertung ist aufgrund der Tieranzahl (n=1) nicht möglich.



Für die Kathepsine wirkt sich die Expositionszeit nur im Falle von Kathepsin B auf das Ergebnis aus. Nach einer Stunde Expositionszeit lässt sich aus der Untersuchung eine Abnahme der Signalstärke am Tag 3 nach Arthritisinduktion nachweisen, obwohl sich nach 10 min und 30 min Expositionszeit noch eine leichte Erhöhung des Expressionsprofils in der akuten Phase der AIA nachweisen lässt.



**Abb. 22: Darstellung der Ergebnisse für TIMP-1, TIMP-3 und Stefin 2 im zeitlichen Verlauf der cDNA-Array-Analysen im Vergleich.** Es wird ein Vergleich einer Versuchsreihe zu verschiedenen Zeitpunkten der Exposition des Arrays auf dem Röntgenfilm nach Messung der Intensität von jeweils zwei Spots  $[(\text{Density}_{\text{Spot}} \cdot \text{Area}_{\text{Spot}}) - (\text{Density}_{\text{Background}} \cdot \text{Area}_{\text{Spot}})]$  gezeigt und ist dargestellt als Mittelwerte in  $\text{Pixel}/\text{mm}^2$ . Eine stat. Auswertung ist aufgrund der Tieranzahl ( $n=1$ ) nicht möglich.

Stefin 2 zeigt nach einer Stunde Expositionszeit ein anderes Bild als nach 30 min, aber ein ähnliches wie nach 10 min Expositionszeit. Die Ergebnisse für TIMP-1 und TIMP-3 ändern sich in prozentualer Betrachtung nach verschiedenen Expositionszeiten nicht.

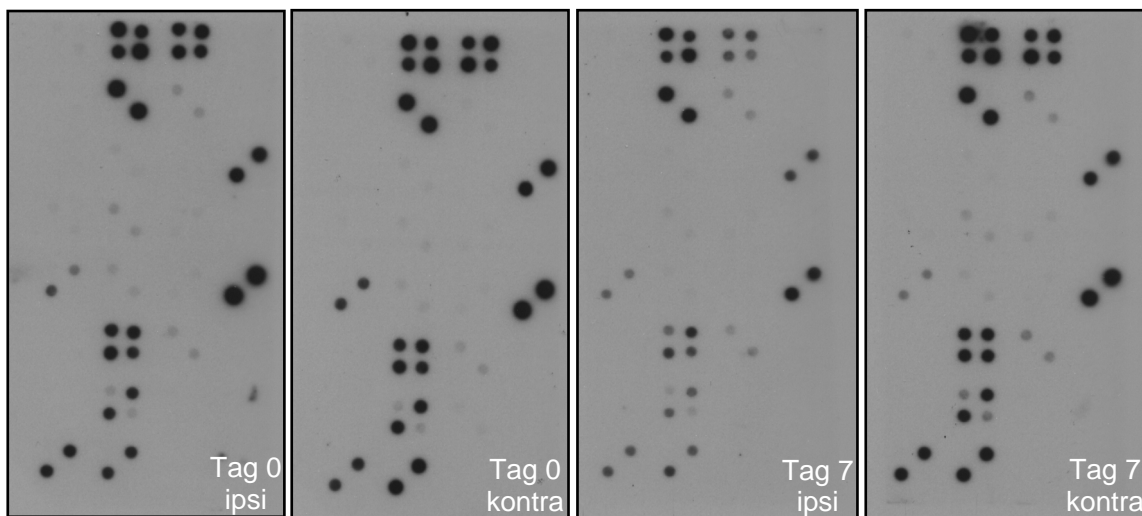
## Zusammenfassung

Die cDNA-Array-Untersuchungen zeigten für einige der untersuchten Proteinasen ein interessantes, reproduzierbares Bild. Vorallem für MMP-3 und TIMP-1 konnte das Ergebnis einer Zunahme der Signalstärken am Tag 3 nach Arthritisinduktion in der gleichen Deutlichkeit reproduziert werden. Dies kann daran liegen, dass sowohl MMP-3 als auch TIMP-1 am Tag 0 vor Arthritisinduktion anhand der Arrays nicht detektierbar waren und erst im Verlauf der Arthritis sichtbar wurden. Bei anderen Genen war die Reproduktion schwieriger, da sie schon am Tag 0, welche als Kontrollgruppe herangezogen wurde, eine hohe Signalstärke aufwies und eine weitere Expressionsänderung mit diesem System nicht mehr detektiert werden konnte. MMP-12, Kathepsin B und Kathepsin L konnten ebenfalls ähnlich gut reproduziert werden. Die weiteren untersuchten Gene MMP-2, MMP-9, Kathepsin K, Kathepsin S, TIMP-3 und Stefin 2 zeigten entweder eine Übereinstimmung am Tag 3 oder am Tag 14 nach Arthritisinduktion. So konnte erst nach Hinzuziehen der Ergebnisse der Real Time PCR eine Aussage über Tendenzen und mögliche Fehlerquellen gemacht werden.

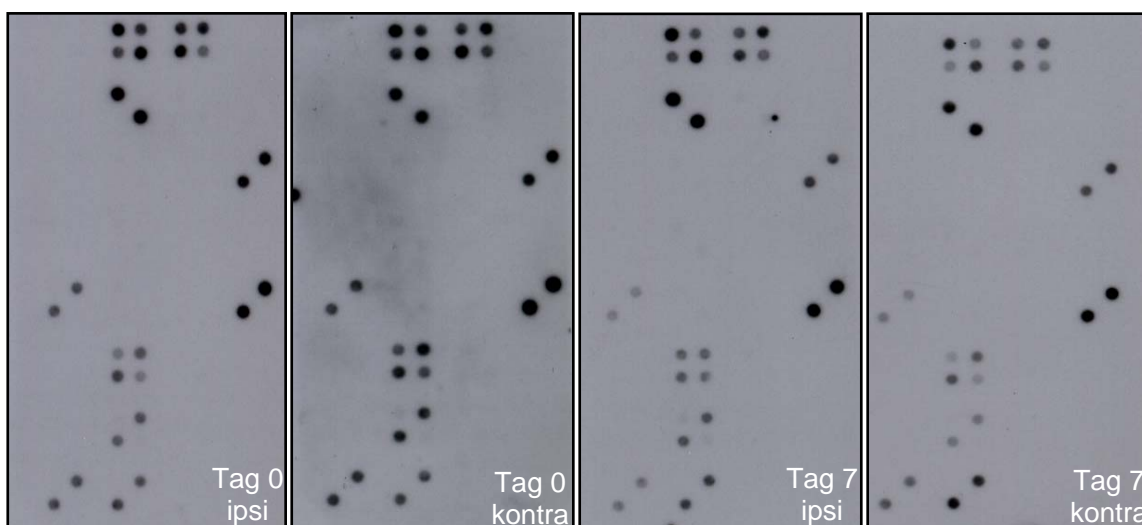
Die Expositionszeit der Arrays spielte in Bezug auf die untersuchten Proteinasen eine eher untergeordnete Rolle, da sich das Expressionsmuster im Laufe der Expositionszeit nicht prozentual veränderte. Nach 10 Minuten konnte in den meisten Fällen noch keine exakte Angabe zu Expressionsunterschieden der einzelnen Proben gemacht werden, da das Signal noch zu schwach war. Es wurden im weiteren Verlauf der Untersuchung und Auswertung die Ergebnisse der 30-minütigen Expositionszeit gewählt, weil bei längerer Expositionszeit der Hintergrund sehr stark wurde und eine Abgrenzung schwächerer Spots nicht mehr zuließ. Auch wurde das Bild stark hin zu positiven Ergebnissen verzerrt, was beispielsweise bei Kathepsin S zu sehen war. Da näherte sich die Expression am Tag 3 nach Arthritisinduktion dem Niveau am Tag 14 an, obwohl in den vorigen Messungen die differentielle Expression am Tag 14 höher zu sein schien als am Tag 3. Der Röntgenfilm ist dann abgesättigt und kann nicht noch höhere Werte für die Expression am Tag 14 aufweisen. Auch die ausgewählten Housekeeping-Gene zeigen spätestens nach einer Stunde Expositionszeit des Arrays auf dem Film eine Absättigung, was die Ergebnisse in die falsche Richtung lenken würde. GAPDH kam aufgrund der starken Expression als Housekeeping-Gen zum Abgleich der Ergebnisse nicht in Frage.

### 3.2.2 cDNA-Array-Analysen von RNA aus kultivierten Synoviozyten

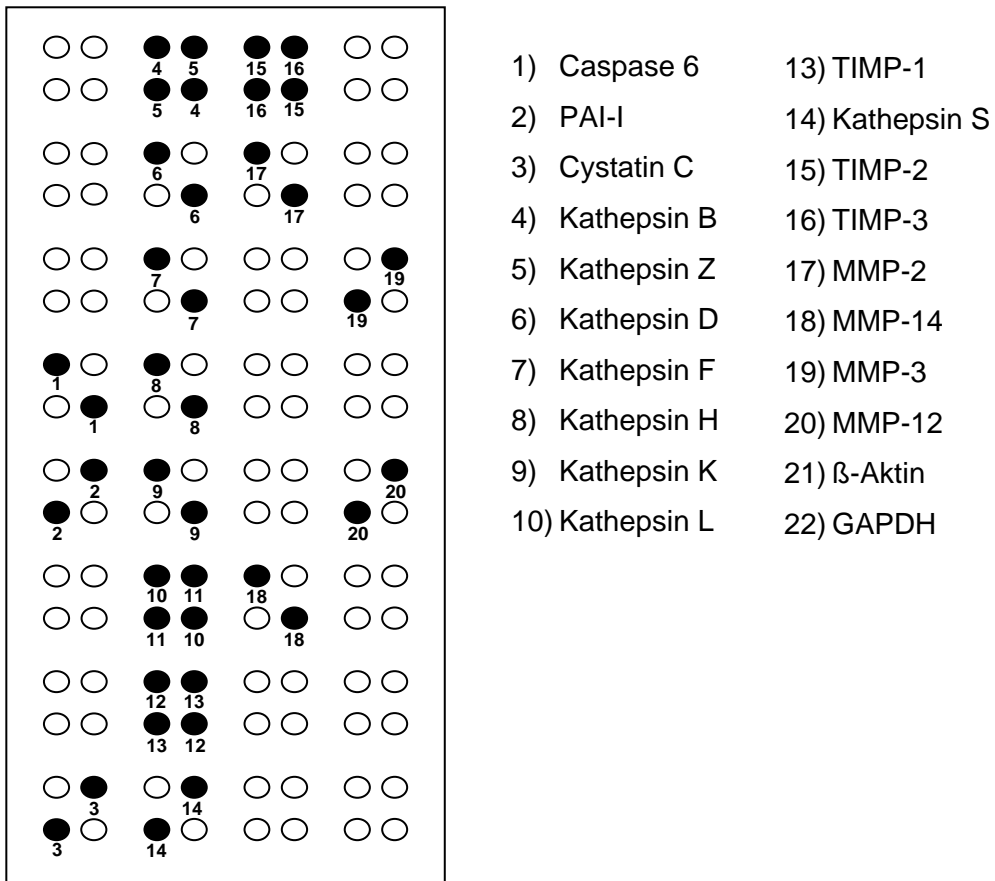
Den *in vivo*-Untersuchungen schlossen sich Untersuchungen von RNA aus kultivierten fibroblastenähnlichen Synoviozyten (FLS) an, da es sich bei den *in vivo*-Untersuchungen um die Analyse eines Zellgemisches handelte und über den Ursprung der differentiell exprimierten Proteinase keine konkreten Angaben gemacht werden konnte. Mit den Analysen von RNA aus kultivierten Zellen soll gezeigt werden, in welcher Art und Stärke FLS an der differentiellen Expression der verschiedenen Proteinase beteiligt sind. Es zeigte sich für MMP-3 eine ähnliche Hochregulation wie in den *in vivo*-Versuchen und weist darauf hin, dass arthritische FLS an der differentiellen Expression von MMP-3 beteiligt sind.



**Abb. 23:** Darstellung der cDNA-Arrays, erste Versuchsreihe der Untersuchungen von kultivierten FLS, 30 min Exposition.

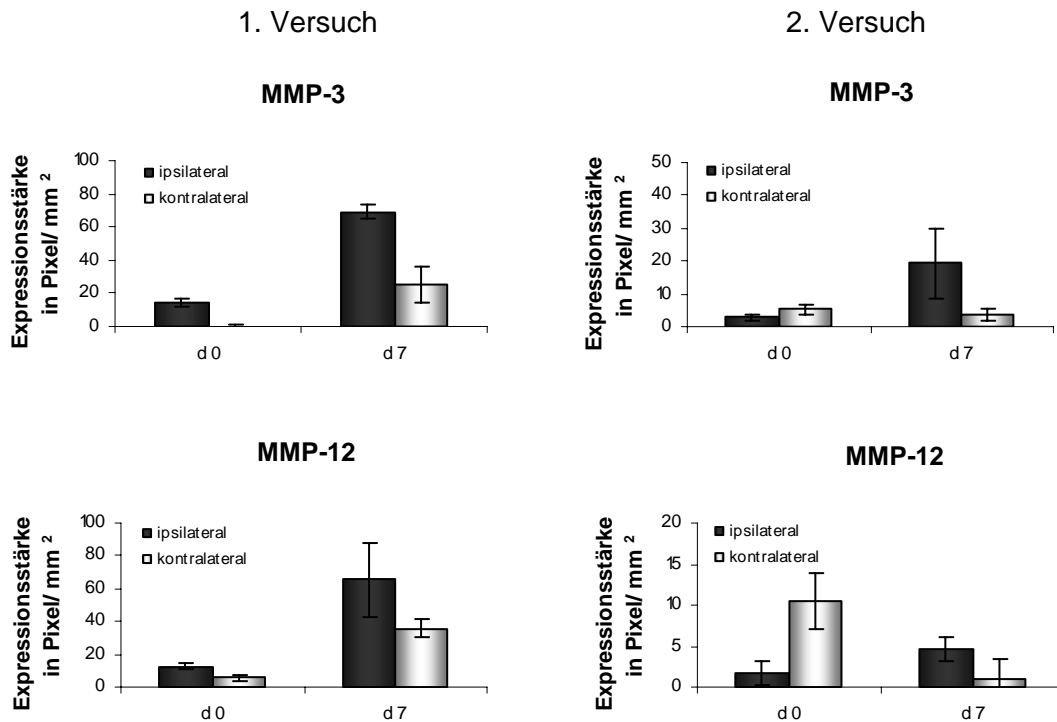


**Abb. 24:** Darstellung der cDNA-Arrays, zweite Versuchsreihe der Untersuchungen von kultivierten FLS, 30 min Exposition.



**Abb. 25: Legende zu Abb. 23 + 24 zur Identifizierung der sichtbaren Spots der Untersuchungen von kultivierten FLS.**

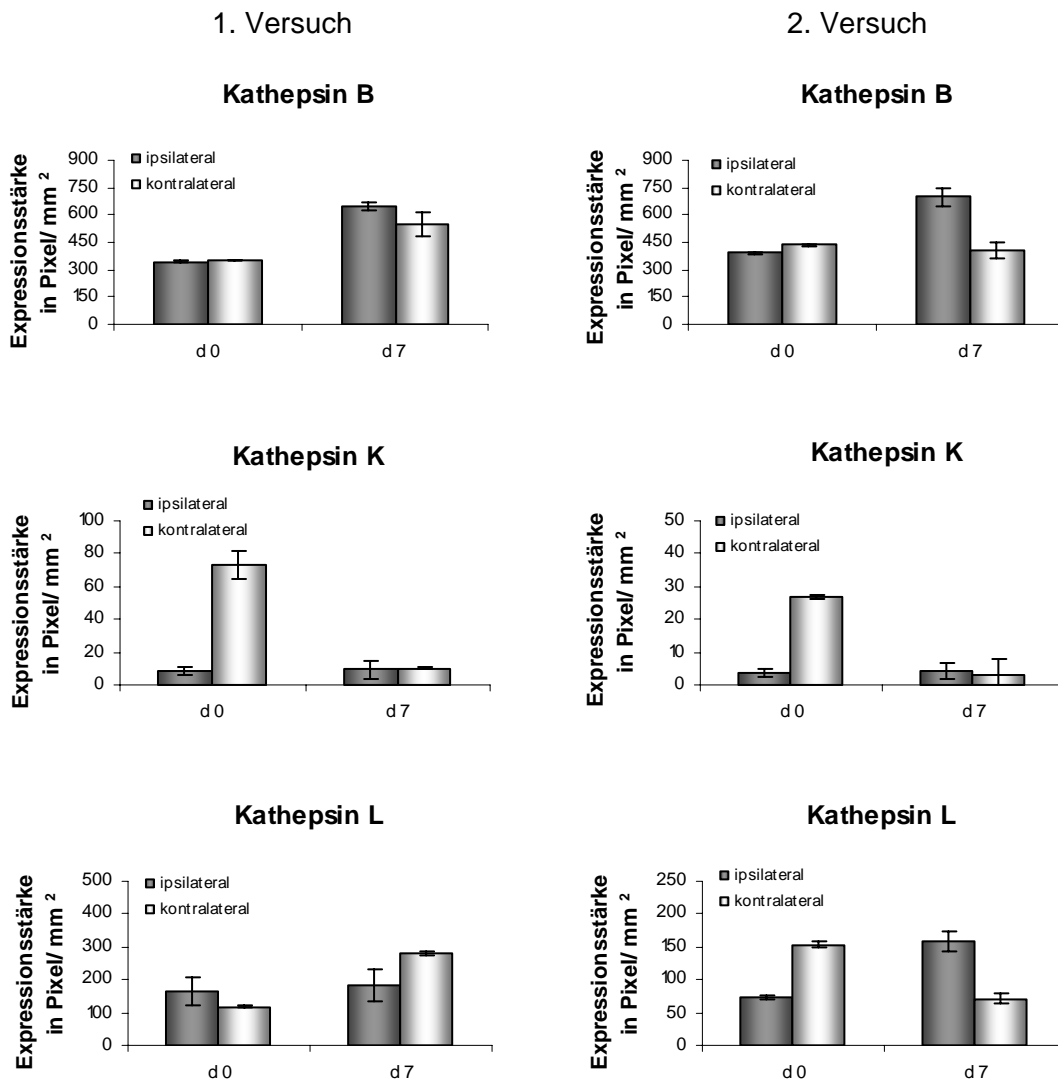
## Vergleich des Expressionsverlaufs von zwei Versuchsreihen für kultivierte Synoviozyten



**Abb. 26: Vergleich der Expressionsverläufe der ersten und zweiten Versuchsreihe für MMP-3 und MMP-12 von kultivierten FLS nach 30 min Expositionszeit.** Es wird ein Vergleich von zwei Versuchsreihen nach Messung der Intensität von jeweils zwei Spots  $[(\text{Density}_{\text{Spot}} \cdot \text{Area}_{\text{Spot}}) - (\text{Density}_{\text{Background}} \cdot \text{Area}_{\text{Spot}})]$  gezeigt und ist dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM einer repräsentativen Studie von 5-6 Tieren pro Gruppe. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in  $\text{Pixel}/\text{mm}^2$ .

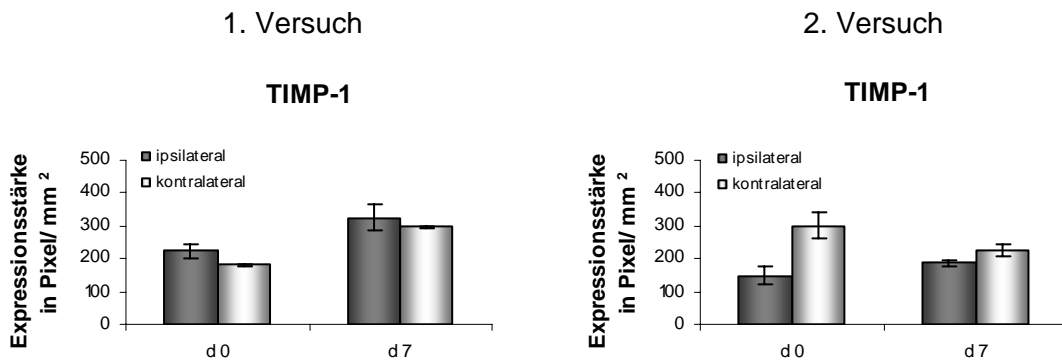
Für MMP-3 kann wie auch schon für die *in vivo*-Versuche die signifikanteste Veränderung in Form einer Zunahme der Signalstärke am Tag 7 nach Arthritisinduktion auf der ipsilateralen, nicht aber auf der kontralateralen Seite gezeigt werden.

MMP-12 zeigt kein eindeutiges Bild, daher können keine Aussagen zur differentiellen Expression gemacht werden.



**Abb. 27: Vergleich der Expressionsverläufe der ersten und zweiten Versuchsreihe für Kathepsin B, K und L von kultivierten FLS nach 30 min Expositionszeit.** Es wird ein Vergleich von zwei Versuchsreihen nach Messung der Intensität von jeweils zwei Spots  $[(Density_{Spot} * Area_{Spot}) - (Density_{Background} * Area_{Spot})]$  gezeigt und ist dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM einer repräsentativen Studie von 5-6 Tieren pro Gruppe. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in  $Pixel/mm^2$ .

Kathepsin B wird im Übergang zur chronischen Phase auf mRNA-Level vermehrt detektiert. Auch auf der kontralateralen Seite kann eine leichte Erhöhung registriert werden. Kathepsin K zeigt interessanterweise eine deutliche Abnahme der Signalstärke am Tag 7 nach Arthritisinduktion allerdings nur im Vergleich zum kontralateralen Gelenk am Tag 0 vor Arthritisinduktion. Für Kathepsin L zeigt sich ein kein einheitliches Bild.



**Abb. 28: Vergleich der Expressionsverläufe der ersten und zweiten Versuchsreihe für TIMP-1 von kultivierten FLS nach 30 min Expositionszeit.** Es wird ein Vergleich von zwei Versuchsreihen nach Messung der Intensität von jeweils zwei Spots  $[(\text{Density}_{\text{Spot}} \cdot \text{Area}_{\text{Spot}}) - (\text{Density}_{\text{Background}} \cdot \text{Area}_{\text{Spot}})]$  gezeigt und ist dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM einer repräsentativen Studie von 5-6 Tieren pro Gruppe. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in  $\text{Pixel}/\text{mm}^2$ .

TIMP-1 zeigt ebenfalls in der ersten Versuchsreihe eine Zunahme der Signalstärke auf der ipsi- und kontralateralen Seite nach Arthritisinduktion. Das Ergebnis der ipsilateralen, nicht aber der kontralateralen Seite kann im zweiten Versuch bestätigt werden.

### Zusammenfassung

In den Untersuchungen von kultivierten FLS auf mRNA-Ebene kann für MMP-3, Kathepsin B und Kathepsin K in beiden Versuchsreihen ein ähnliches Ergebnis erzielt werden. Das stellt bezüglich der Reliabilität der cDNA Arrays ein positives Ergebnis dar. Die Kandidatengene wurden nach den Ergebnissen der *in vivo*-Untersuchungen ausgewählt. Die übrigen Untersuchungen bezüglich MMP-12, Kathepsin L und TIMP-1 brachten kein eindeutiges Ergebnis. Möglicherweise liegen die Fehler in der zweiten Versuchsreihe an einer Hintergrundverfälschung wegen unsachgemäßer Handhabung der Arrays.



### 3.3 Real Time PCR-Analysen

Um die per cDNA-Arrays ermittelten Daten der Expressionsanalyse überprüfen zu können, werden die bereits untersuchten Proben einer weiteren Analyse mittels Real Time PCR unterzogen. Mit der Methode der Real Time PCR kann durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, der sich an doppelsträngige DNA anlagert, die Menge von gebildeten PCR-Produkten während der exponentiellen Phase der PCR gemessen und über vorher bestimmte Standardkurven die Konzentration eines Produktes bestimmt werden. Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht dabei nicht auf absoluten DNA-Mengen des PCR-Produktes, sondern auf der Kinetik des Entstehens dieser Produkte. Dafür nimmt man als Richtlinie den Ct-Wert (Fluoreszenz-Schwellenwert, sog. Threshold Cycle), da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und in dieser Phase der PCR-Reaktion keine limitierenden Faktoren aufweist wie Primer- oder Nukleotidmangel bzw. keine nachlassende enzymatische Aktivität. Der Ct-Wert ist derjenige PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt (Kap. 2.2.3.2, Abb. 9). Parallel dazu werden bei jedem PCR-Lauf bekannte Mengen an Templates amplifiziert, so dass man vergleichen kann, welche Templatemenge welchem Ct-Wert entspricht. Daraus lässt sich eine Standardkurve erstellen, anhand derer man aus einem bestimmten Ct-Wert auf eine Templatekonzentration schließen kann.

Zum Abschluss der PCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Rotorgenesoftware kann dadurch die Menge der Primer-Dimere verrechnen, die in den Rohdaten noch enthalten ist und in den eigentlichen Analysedaten unsichtbar machen.

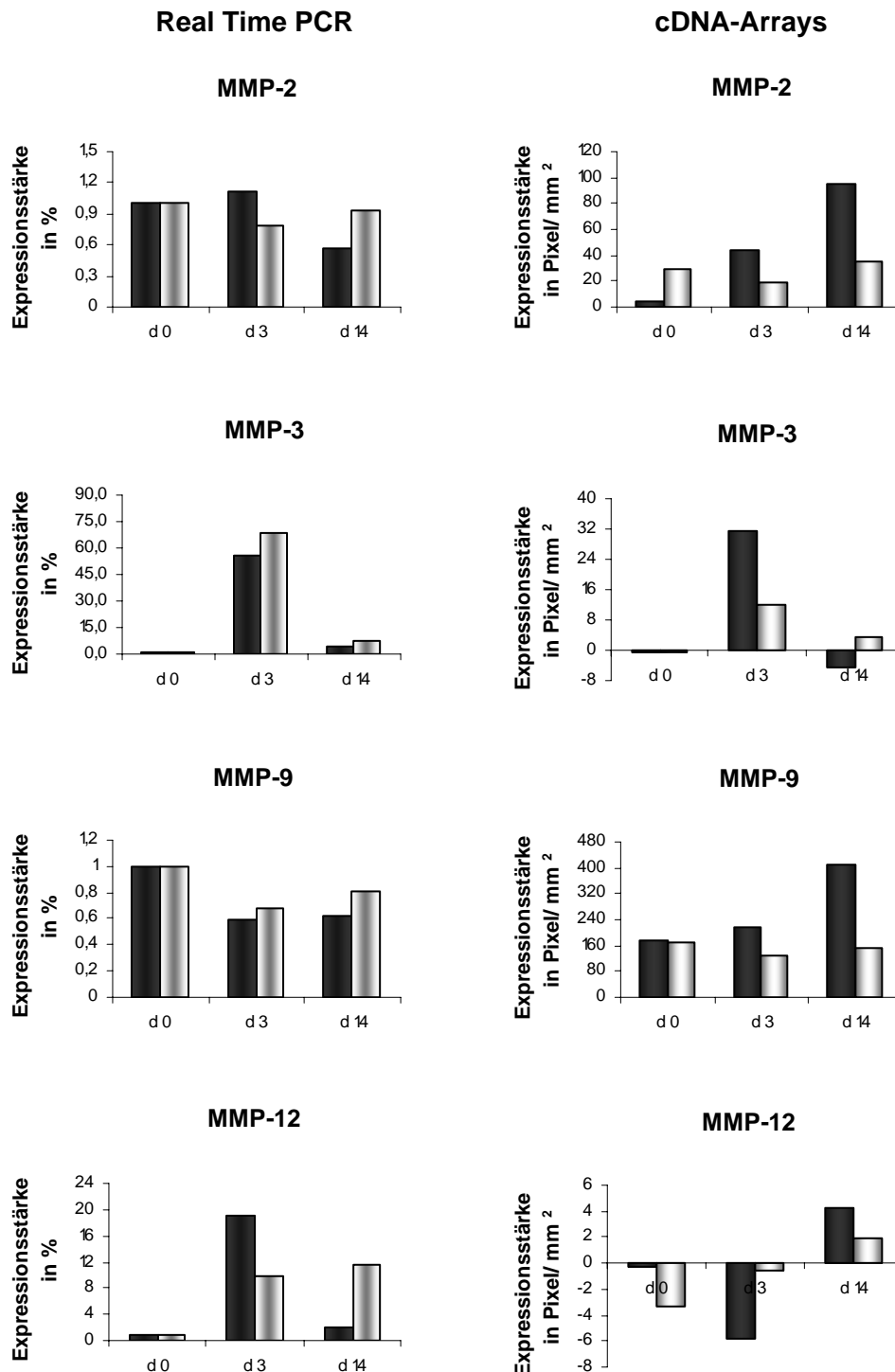
**Tab. 15: Primerdesign für Real Time PCR-Experimente.** Die Primer wurden von Dr. E. Birch-Hirschfeld vom Institut für Virologie der FSU Jena synthetisiert.

Name	Sequenz	Größe
mCath B - RT/1	5'-CTg CCA TgA TCT CCT TCA CA-3'	20mer
mCath B - RT/2	5'-AgT TgA CAg gCT CCg AgA AA-3'	20mer
mCath K - RT/1	5'-ggg CCA ggA TgA AAg TTg TA-3'	20mer
mCath K - RT/2	5'-CAC TgC TCT CTT CAg ggC TT-3'	20mer
mCath L - RT/1	5'-ATC CCC AAg TCT gTg gAC Tg-3'	20mer
mCath L - RT/2	5'-TCA gTg AgA TCA gTT TgC Cg-3'	20mer
mCath S - RT/1	5'-AgA gAA ggg CTg CgT CAC T-3'	19mer
mCath S - RT/2	5'-gAT ATC AgC TTC CCC gTT TTC Ag-3'	23mer
mMMP 2 - RT/1	5'-AgC gTg AAg TTT ggA AgC AT-3'	20mer
mMMP 2 - RT/2	5'-CAC ATC CTT CAC CTg gTg Tg-3'	20mer
mMMP 3 - RT/1	5'-Tgg AgA TgC TCA CTT TgA Cg-3'	20mer
mMMP 3 - RT/2	5'-gCC TTg gCT gAg Tgg TAg Ag-3'	20mer
mMMP 9 - RT/1	5'-CAT TCg CgT ggA TAA ggA gT-3'	20mer
mMMP 9 - RT/2	5'-ATT TTg gAA ACT CAC ACg CC-3'	20mer
mMMP 12 - RT/1	5'-TTT ggA gCT CAC ggA gAC TT-3'	20mer
mMMP 12 - RT/2	5'-CAC gTT TCT gCC TCA TCA AA-3'	20mer
mTIMP 1 - RT/1	5'-ggTgTTTCCCTgTTTATC-3'	18mer
mTIMP 1 - RT/2	5'-TAgTTCTTTATTTCCACCATCT-3'	21mer
mTIMP 3 - RT/1	5'-TTg ggT ACC CTg gCT ATC Ag-3'	20mer
mTIMP 3 - RT/2	5'-Agg TCT ggg TTC Agg gAT CT-3'	20mer
mStef 2 - RT/1	5'-TgC TgA CAA ggT CAg ACC AC-3'	20mer
mStef 2 - RT/2	5'-gCA ACC ACg TCC TAC ATT CA-3'	20mer
mβ-Aktin - RT/1	5'-CCA CAg CTg AgA ggg AAA TC-3'	20mer
mβ-Aktin - RT/2	5'-TCT CCA ggg Agg AAg Agg AT-3'	20mer

### 3.3.1 Real Time PCR-Analysen von direkt (*in vivo*) isolierter RNA

Die Analyse der cDNA-Arrays hat eine Zunahme der Signalstärke von MMP-3 in der akuten Phase der AIA am Tag 3 ergeben. Dieses Ergebnis konnte durch die Analyse per Real Time PCR bestätigt werden (siehe Abb. 29). Auch bei TIMP-1 kann, wenn auch nicht so deutlich wie bei MMP-3, durch die Real Time PCR eine gesteigerte Expression am Tag 3 der AIA nachgewiesen werden (siehe Abb. 31), so wie es die Ergebnisse der Array-Experimente implizierten.

## Vergleich der Ergebnisse der Real Time PCR-Analysen mit den entsprechenden cDNA-Array-Ergebnissen für beide Versuchsreihen



**Abb. 29: Vergleich der Ergebnisse für MMP-2, -3, -9 und -12 von Real Time PCR und cDNA-Arrays für Gesamt-RNA aus Kniegelenken am Tag 0 vor Arthritisinduktion und an Tag 3 + 14 nach Auslösen der AIA.**

■ = erste Versuchsreihe, □ = zweite Versuchsreihe

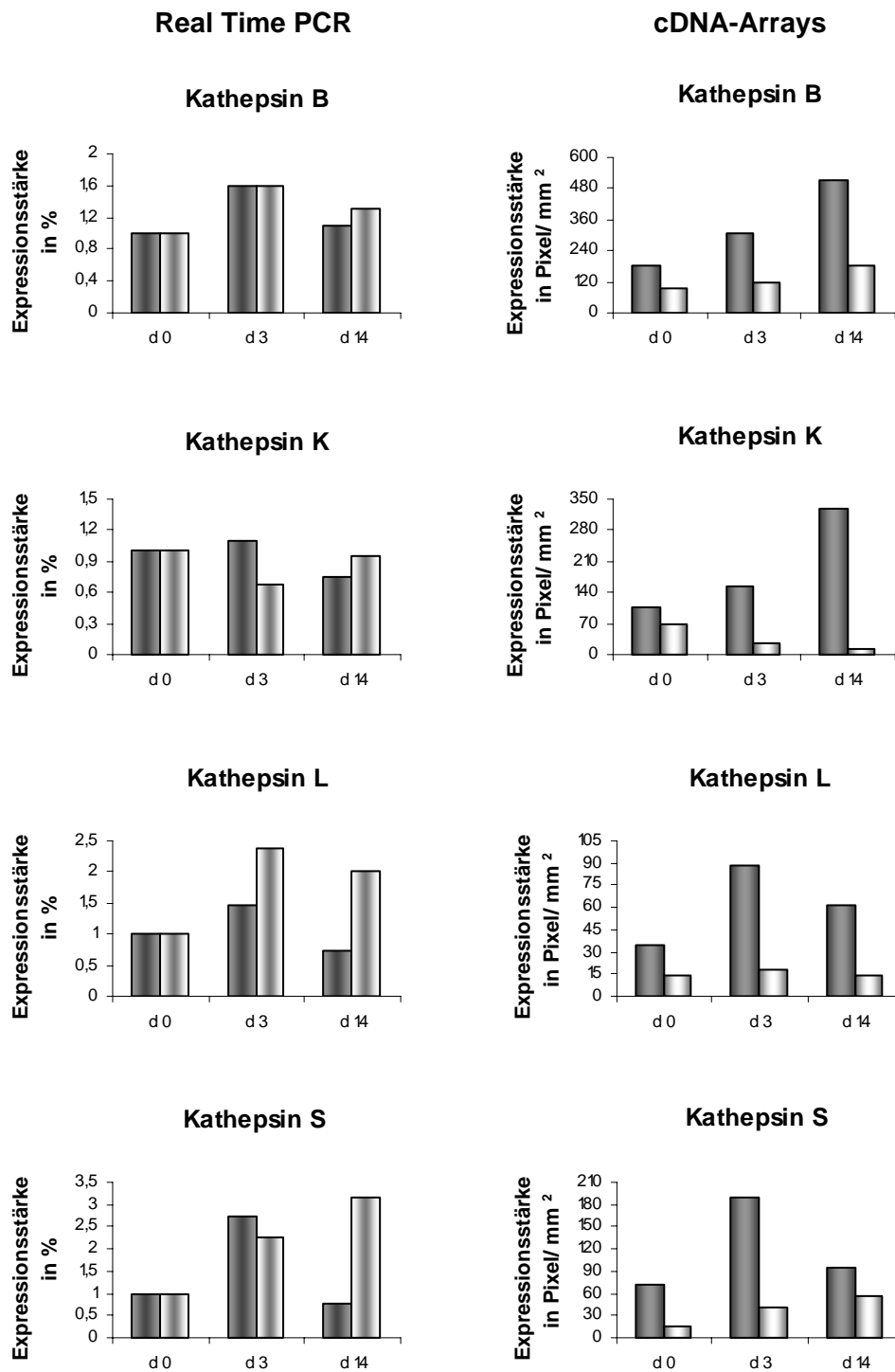
Die Darstellung der Ergebnisse der Real Time PCR erfolgt als Mittelwerte in %, wobei der Bezug d 0 = 1,0 ist. Die Darstellung der Ergebnisse der cDNA-Array-Untersuchungen erfolgt als Mittelwerte in Pixel/ mm<sup>2</sup>. Eine stat. Auswertung ist aufgrund der Tieranzahl (n=1) nicht möglich.

Die mittels cDNA-Arrays ermittelten Ergebnisse für MMP-2 können durch Real Time PCR nicht bestätigt werden. In der ersten Versuchsreihe zeigt sich bei beiden Untersuchungsmethoden eine Zunahme der Signalstärke am Tag 3 der AIA. In der chronischen Phase differieren die Ergebnisse allerdings. In der zweiten Versuchsreihe stimmen die Ergebnisse von Real Time PCR und cDNA-Arrays überein. Einem Abfall der Signalstärke folgt ein Wiederanstieg am Tag 14 nach Arthritisinduktion.

Von allen untersuchten Proteinase zeigte MMP-3 die deutlichste Veränderung im Expressionsmuster. Sowohl die Untersuchung mittels cDNA-Arrays als auch die anschließende Kontrolle durch Real Time PCR zeigten das gleiche Ergebnis. MMP-3 wird in der akuten Phase der AIA hochreguliert, um anschließend wieder abzufallen.

MMP-9 zeigt in den Untersuchungen mittels Real Time PCR eine Abnahme der Signalstärke am Tag 3 der AIA. Diese Ergebnisse stimmen in der zweiten Versuchsreihe mit den Ergebnissen der cDNA-Array-Untersuchungen überein. In der ersten Versuchsreihe kann das Ergebnis nicht bestätigt werden. MMP-9 zeigt schon am Tag 0 auf den cDNA-Arrays ein sehr starkes Signal. Offensichtlich kann die nur leichte Veränderung in der ersten Versuchsreihe im Expressionsmuster am Tag 3 deshalb nicht detektiert werden.

Die Ergebnisse für MMP-12 streuen sehr stark. So kann weder in beiden Versuchsreihen der Real Time PCR noch im Vergleich von Real Time PCR und cDNA-Arrays ein einheitliches Ergebnis erzielt werden. MMP-12 wird auf den Arrays am Tag 0 und Tag 3 nicht detektiert. Erst am Tag 14 zeigt sich eine Zunahme der Signalstärke in beiden Versuchsreihen.



**Abb. 30: Vergleich der Ergebnisse für Kathepsin B, K, L und S von Real Time PCR und cDNA-Arrays für Gesamt-RNA aus Kniegelenken am Tag 0 vor Arthritisinduktion und an Tag 3 + 14 nach Auslösen der AIA.**

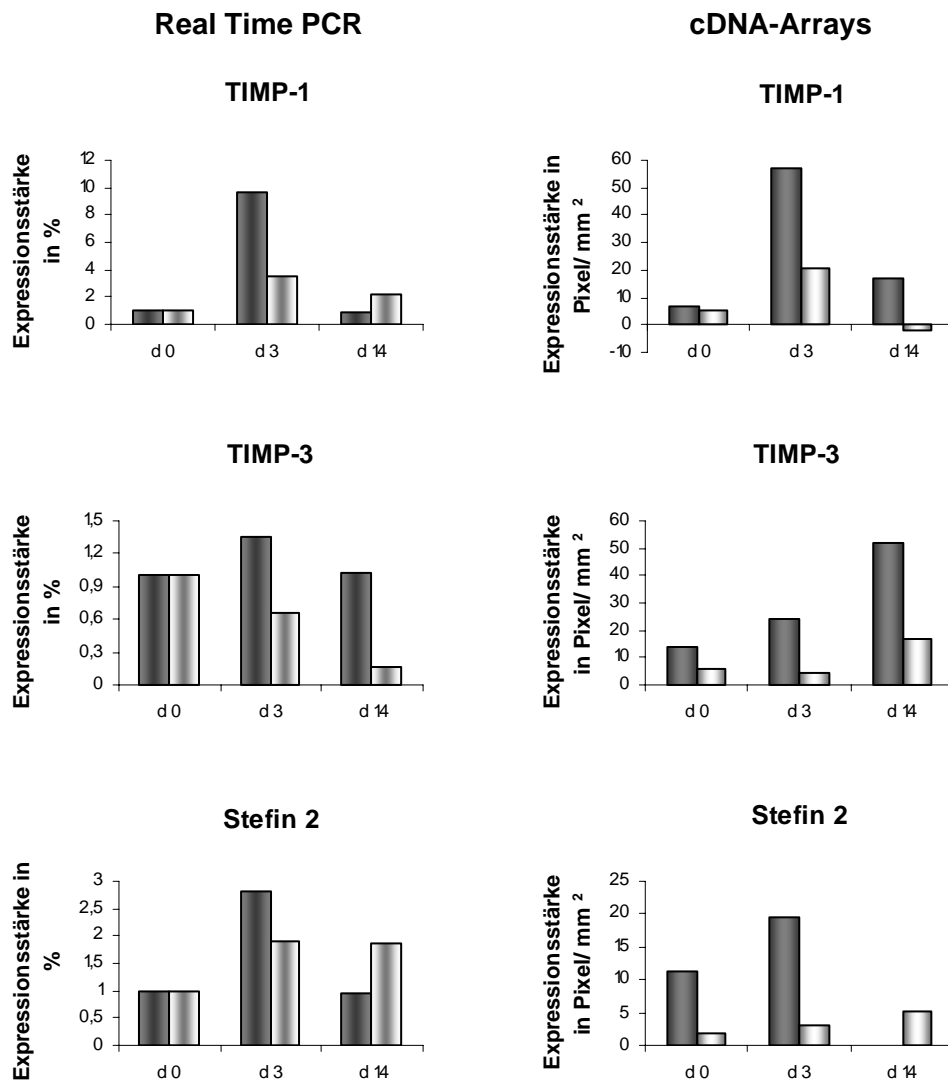
■ = erste Versuchsreihe, □ = zweite Versuchsreihe

Die Darstellung der Ergebnisse der Real Time PCR erfolgt als Mittelwerte in %, wobei der Bezug d 0 = 1,0 ist. Die Darstellung der Ergebnisse der cDNA-Array-Untersuchungen erfolgt als Mittelwerte in Pixel/ mm<sup>2</sup>. Eine stat. Auswertung ist aufgrund der Tieranzahl (n=1) nicht möglich.

Kathepsin B zeigt in beiden Untersuchungsreihen und mit beiden Untersuchungsmethoden eine Zunahme der Signalstärke am Tag 3 nach Arthritisinduktion. In der chronischen Phase differieren die Ergebnisse allerdings. Während in den Untersuchungen mittels Real Time PCR die Signalstärke am Tag 14 wieder abfällt, steigt sie in den Ergebnissen der cDNA Array-Untersuchungen weiter an.

Für Kathepsin K kann weder innerhalb einer Untersuchungsmethode noch im Vergleich der Ergebnisse von Real Time PCR und cDNA-Arrays ein ähnliches Gesamtergebnis erzielt werden. Allerdings ähneln sich die Tendenzen der Signalstärkeentwicklung in der Untersuchung der akuten Phase der AIA im Vergleich von Real Time PCR- und cDNA-Array-Experimenten.

Kathepsin L zeigt in beiden Versuchsreihen und mit beiden Untersuchungsmethoden eine Zunahme der Signalstärke in der akuten Phase der AIA und einen Abfall im weiteren Verlauf. In beiden Versuchsreihen und mit beiden Untersuchungsmethoden zeigte sich für Kathepsin S eine Hochregulation am Tag 3 nach Arthritisinduktion. In der ersten Versuchsreihe fällt das Signalstärkenlevel in der chronischen Phase der AIA wieder ab, in der zweiten Versuchsreihe steigt es weiter an. Hier stimmen nun jeweils die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsmethoden überein. Eine an Stichproben umfangreichere Untersuchung könnte Aufschluß über die tatsächliche Expression von Kathepsin S in der chronischen Phase der AIA geben.



**Abb. 31: Vergleich der Ergebnisse für TIMP-1 von Real Time PCR und cDNA-Arrays für Gesamt-RNA aus Kniegelenken am Tag 0 vor Arthritisinduktion und an Tag 3 + 14 nach Auslösen der AIA.**

■ = erste Versuchsreihe, □ = zweite Versuchsreihe

Die Darstellung der Ergebnisse der Real Time PCR erfolgt als Mittelwerte in %, wobei der Bezug d 0 = 1,0 ist. Die Darstellung der Ergebnisse der cDNA-Array-Untersuchungen erfolgt als Mittelwerte in Pixel/ mm<sup>2</sup>. Eine stat. Auswertung ist aufgrund der Tieranzahl (n=1) nicht möglich.

Wieder ein deutliches Bild zeigt TIMP-1 in beiden Versuchsreihen und mit beiden Untersuchungsmethoden. Am Tag 3 nach Arthritisinduktion erfolgt ein deutliche Zunahme der Signalstärke von TIMP-1 auf mRNA-Ebene.

TIMP-3 zeigt in beiden Versuchsreihen ein unterschiedliches Bild. Einer Zunahme der Signalstärke in der akuten Phase der AIA in der ersten Versuchsreihe steht eine Abnahme in der zweiten Versuchsreihe gegenüber. Im Vergleich der beiden Untersuchungsmethoden untereinander zeigt sich wie schon bei Kathepsin K eine Übereinstimmung bezüglich der akuten Phase der AIA. Dagegen kann über die Signalstärketendenz der chronischen Phase keine Aussage gemacht werden.

Stefin 2 zeigt in beiden Versuchsreihen und beiden Untersuchungsmethoden eine Zunahme der Signalstärke am Tag 3 nach Arthritisinduktion. Auch die Ergebnisse für Tag 14 nach Arthritisinduktion stimmen innerhalb der Versuchsreihen mit den verschiedenen Untersuchungsmethoden überein.



---

## Zusammenfassung

Von allen untersuchten Proteinasen zeigte MMP-3 die deutlichste Veränderung im Expressionsmuster. Sowohl die Untersuchung mittels der cDNA-Arrays als auch die anschließende Kontrolle durch Real Time PCR zeigten in beiden Versuchsreihen das gleiche Ergebnis. Jeweils eine Übereinstimmung der Ergebnisse von cDNA-Arrays und Real Time PCR konnte für MMP-2 als auch MMP-9 gezeigt werden. Für MMP-12 konnte in keiner Versuchsreihe eine Übereinstimmung der Ergebnisse von cDNA-Arrays und Real Time PCR ermittelt werden.

Auch beim Vergleich der beiden Versuchsreihen untereinander kann MMP-3 als einzige untersuchte Metalloproteinase ein ähnliches Ergebnis mit beiden Untersuchungsmethoden aufweisen. Ein ähnliches Ergebnis für beide Versuchsreihen konnte für MMP-9 anhand der Real Time PCR ermittelt werden. Die Ergebnisse der cDNA-Arrays fördern für MMP-9 zwei unterschiedliche Ergebnisse zutage. Keine Übereinstimmung der Ergebnisse für beide Versuchsreihen in den cDNA-Array-Analysen als auch in den Untersuchungen mittels Real Time PCR zeigten sowohl MMP-2 als auch MMP-12.

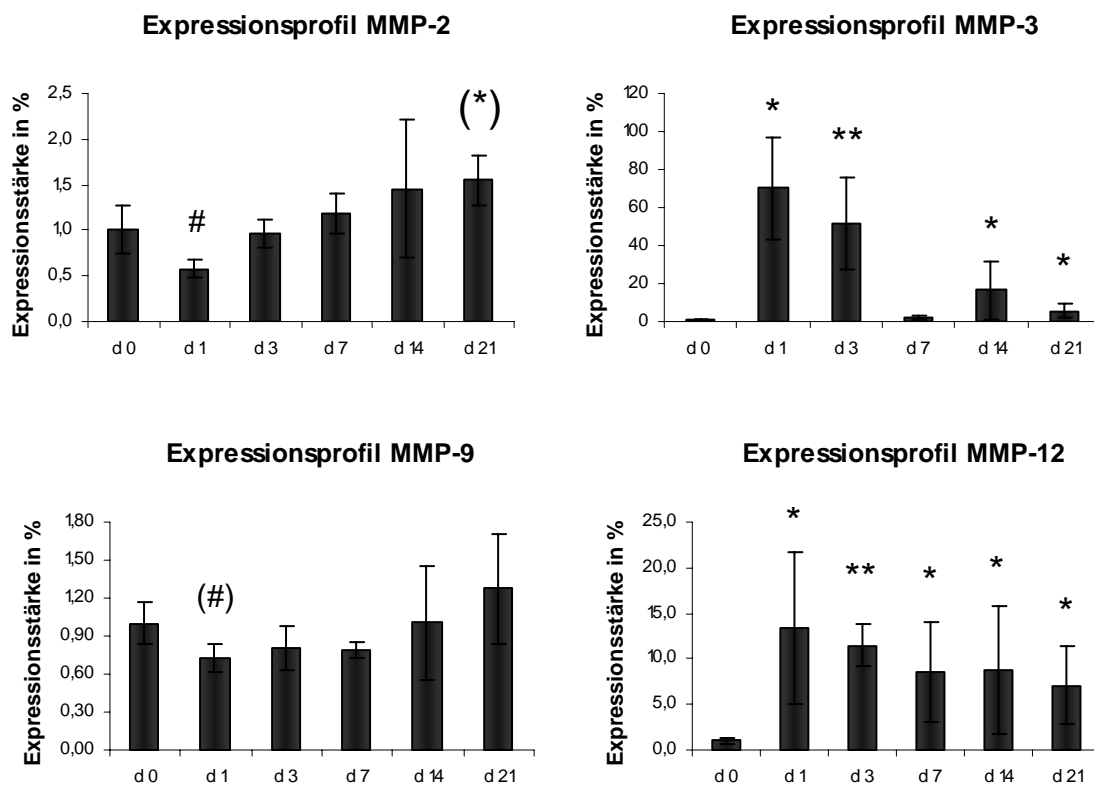
Kathepsin S zeigt mit beiden Untersuchungsmethoden ein ähnliches Ergebnis. Auch für Kathepsin L kann eine solche Übereinstimmung für die Untersuchungen mittels cDNA-Arrays verglichen mit den Ergebnissen der Real Time PCR gezeigt werden. Keine ähnlichen Ergebnisse mit den beiden Untersuchungsmethoden wurden für Kathepsin B und Kathepsin K ermittelt.

Dafür zeigt Kathepsin B beim Vergleich der beiden Versuchsreihen untereinander sowohl in den cDNA-Array-Analysen als auch in den Real Time PCR-Untersuchungen eine komplette Übereinstimmung. Auch Kathepsin L ist wieder mit einem ähnlichem Ergebnis von beiden Versuchsreihen in beiden Versuchsmethoden vertreten. Unterschiedliche Ergebnisse der beiden Versuchsreihen wurden für Kathepsin K und Kathepsin S ermittelt.

Für TIMP-1 konnten die Ergebnisse, die anhand der cDNA-Arrays ermittelt wurden mit den Untersuchungen der Real Time PCR bestätigt werden. Stefin 2 zeigt nur in einer Versuchsreihe ein ähnliches Ergebnis mit beiden Untersuchungsmethoden. Die Ergebnisse der cDNA-Array-Untersuchungen für TIMP-3 konnten anhand der Real Time PCR nicht bestätigt werden. Im Vergleich der beiden Versuchsreihen untereinander zeigt wiederum nur TIMP-1 ein ähnliches Ergebnis für beide Versuchsreihen mit beiden Untersuchungsmethoden. Für Stefin 2 konnte nur anhand der Real Time PCR zweimal ein ähnliches Ergebnis erzielt werden. Die cDNA-Array-Untersuchungen zeigen zwei unterschiedliche Ergebnisse. Für TIMP-3 konnte weder anhand der Real Time PCR noch mit den Auswertungen der cDNA-Arrays das Ergebnis der ersten Versuchsreihe wiederholt werden.

**Erstellung eines Expressionsprofils mit kleineren Zeitfenstern**

Die Methode der Real Time PCR ermöglicht in der gleichen Zeit einen größeren Durchsatz an Proben als die Array-Analysen. Deshalb schließt sich der ersten Bestätigung der Daten, die durch die cDNA-Arrays gewonnen wurden, eine genauere Analyse mit mehr Punkten der Datengewinnung an. Es werden Proben mit RNA von Tag 1, Tag 7 und Tag 21 hinzugefügt, um den Verlauf der Expression bestimmter Proteinase noch exakter bestimmen zu können. So kann man deutlich erkennen, dass die Hochregulation von MMP-3 schon am Tag 1 nach Arthritisinduktion beginnt und am Tag 3 schon wieder eine Herunterregulation erfahren hat. Nach einem Tiefpunkt am Tag 7 erfolgt eine erneute signifikante Hochregulation von MMP-3 am Tag 14 der Arthritis die auch noch am Tag 21 nachweisbar ist.



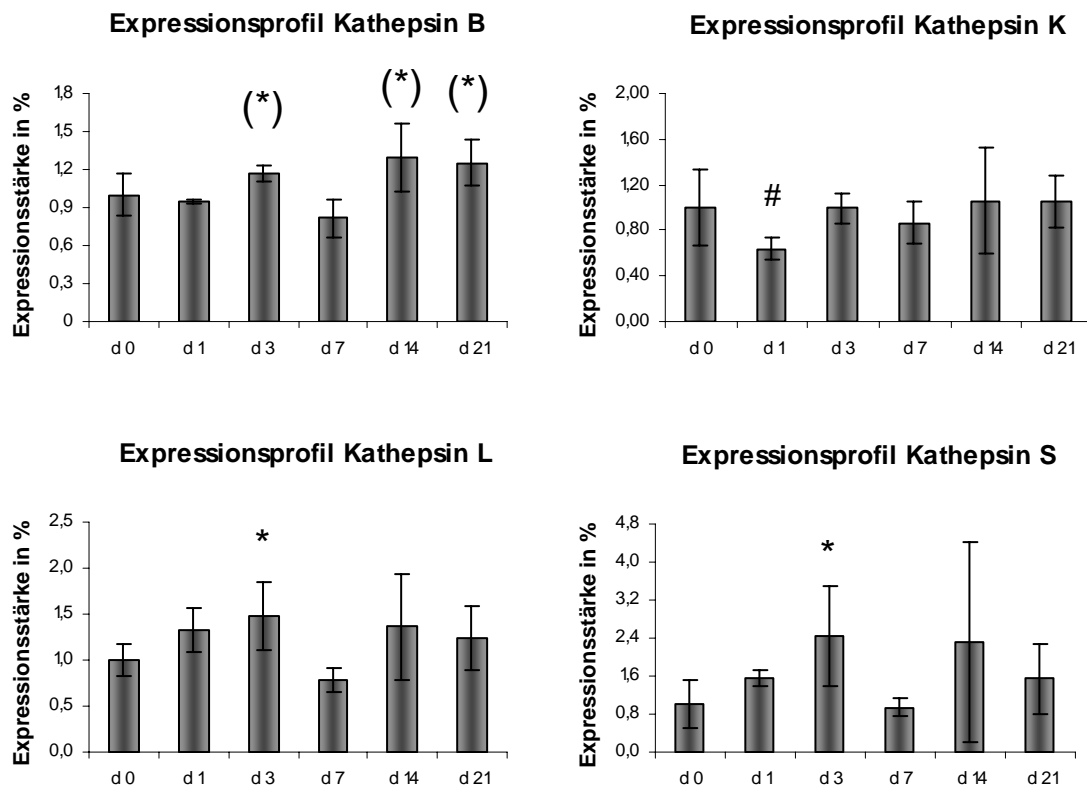
**Abb. 32: Expressionsprofil von MMP-2, -3, -9, -12 von Tag 0 - Tag 21.** n=5 für d 0, d 3, d 14; n=3 für d 1, d 7, d 21. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in %, wobei der Bezug d 0 = 1,0 ist. Signifikante Veränderungen im Vergleich zum d 0 sind durch Sternchen (gesteigerte Expression) und Rauten (verminderte Expression) dargestellt [(#) / (\*) p  $\leq$  0,1; # / \* p  $\leq$  0,1; ## / \*\* p  $\leq$  0,01].

MMP-2 zeigt am Tag 1 nach Arthritisinduktion einen Rückgang in der Expression und einen Wiederanstieg im Verlauf mit einer signifikanten Erhöhung am Tag 21.

Wie schon erwähnt zeigt MMP-3 die deutlichsten Veränderungen im Verlauf der AIA. Es wird am Tag 1 nach Arthritisinduktion schon signifikant hochreguliert und verliert diesen Status trotz leichten Abfallens des Expressionsniveaus in der chronischen Phase auch nicht im weiteren Verlauf der Entzündung.

Obwohl MMP-9 in der Entwicklung der RA eine bedeutende Rolle spielen soll, zeigt es in den Experimenten mittels Real Time PCR nur geringe und dann sogar gegenläufige Veränderungen. Am Tag 1 nach Arthritisinduktion kann eine geringfügige Herunterregulation in der Expression von MMP-9 registriert werden.

MMP-12 zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie MMP-3. Eine deutliche Hochregulation in der akuten Phase der AIA bleibt bis zur chronischen Phase erhalten.



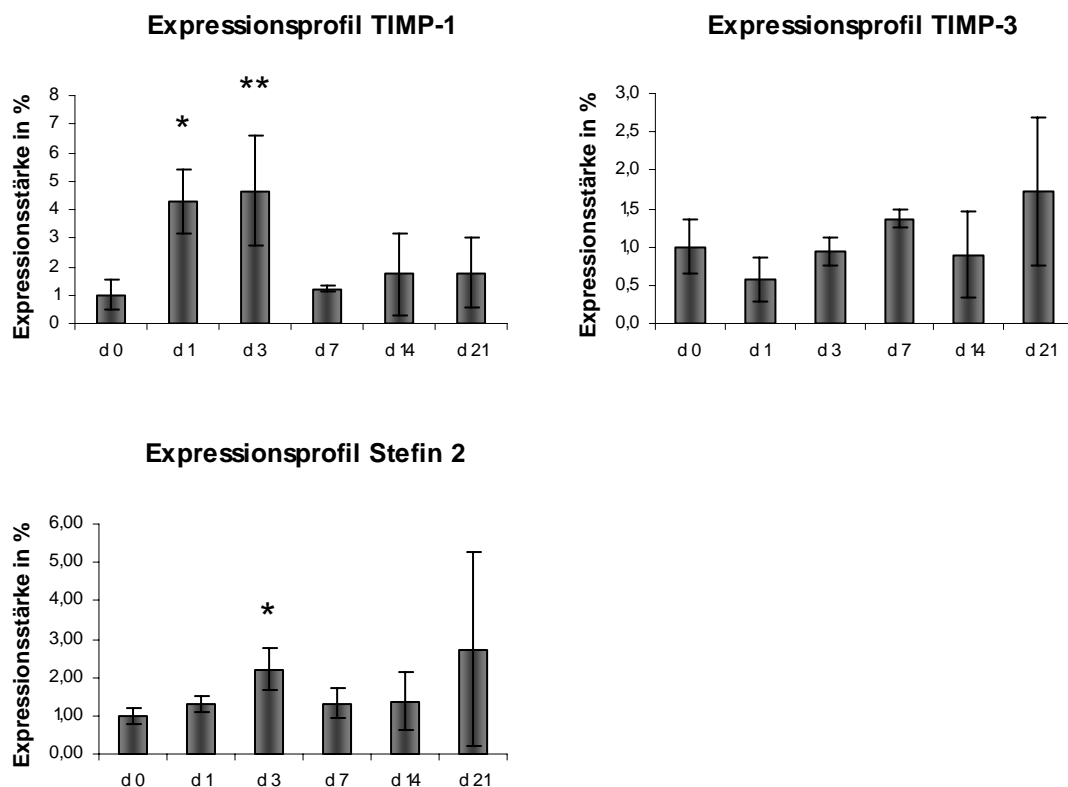
**Abb. 33: Expressionsprofil von Kathepsin B, K, L und S von Tag 0 - Tag 21.** n=5 für d 0, d 3, d 14; n=3 für d 1, d 7, d 21. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in %, wobei der Bezug d 0 = 1,0 ist. Signifikante Veränderungen im Vergleich zum d 0 sind durch Sternchen (gesteigerte Expression) und Rauten (verminderte Expression) dargestellt [(#) / (\*) p  $\leq$  0,1; # / \* p  $\leq$  0,1; ## / \*\* p  $\leq$  0,01].

Kathepsin B zeigt nur leichte Veränderungen, die auch erst mit Verzögerung am Tag 3 nach Arthritisinduktion in Form einer Hochregulation zu Tage treten. Auch in der chronischen Phase am Tag 14 und Tag 21 können erhöhte Expressionmuster detektiert werden.

Kathepsin K zeigte eine signifikante Abnahme der Expression auf mRNA-Level.

Kathepsin L zeigt im Vergleich zu MMP-3, welches am Tag 1 schon die signifikanteste Hochregulation präsentierte, eine deutliche Hochregulation am Tag 3 nach Arthritisinduktion.

Ein ähnliches Bild wie Kathepsin L zeigt auch Kathepsin S mit einer gesteigerten Expression am Tag 3 nach Arthritisinduktion.



**Abb. 34: Expressionsprofil von TIMP-1, TIMP-3 und Stefin 2 von Tag 0 - Tag 21.** n=5 für d 0, d 3, d 14; n=3 für d 1, d 7, d 21. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in %, wobei der Bezug d 0 = 1,0 ist. Signifikante Veränderungen im Vergleich zum d 0 sind durch Sternchen (gesteigerte Expression) und Rauten (verminderte Expression) dargestellt [(#) / (\*) p  $\leq$  0,1; # / \* p  $\leq$  0,01; ## / \*\* p  $\leq$  0,01].

TIMP-1 zeigte von den Inhibitoren die signifikantesten Veränderungen. Es wird am Tag 1 nach Arthritisinduktion verstärkt exprimiert und im Übergang zur chronischen Phase fällt das Expressionslevel wieder ab.

TIMP-3 zeigt nur geringe Veränderungen die statistisch nicht eindeutig belegt werden konnten. Einer Herunterregulation am Tag 1 nach Arthritisinduktion folgt ein Wiederanstieg der Expression um am Tag 14 wieder auf das Ausgangsniveau von Tag 0 zurückzukehren. Das Expressionsprofil von Stefin ähnelt den Proteinasen, welche es inhibiert. Wie schon bei Kathepsin L und Kathepsin S zu beobachten, hat Stefin 2 den höchsten Anstieg der Expression am Tag 3 nach Arthritisinduktion.

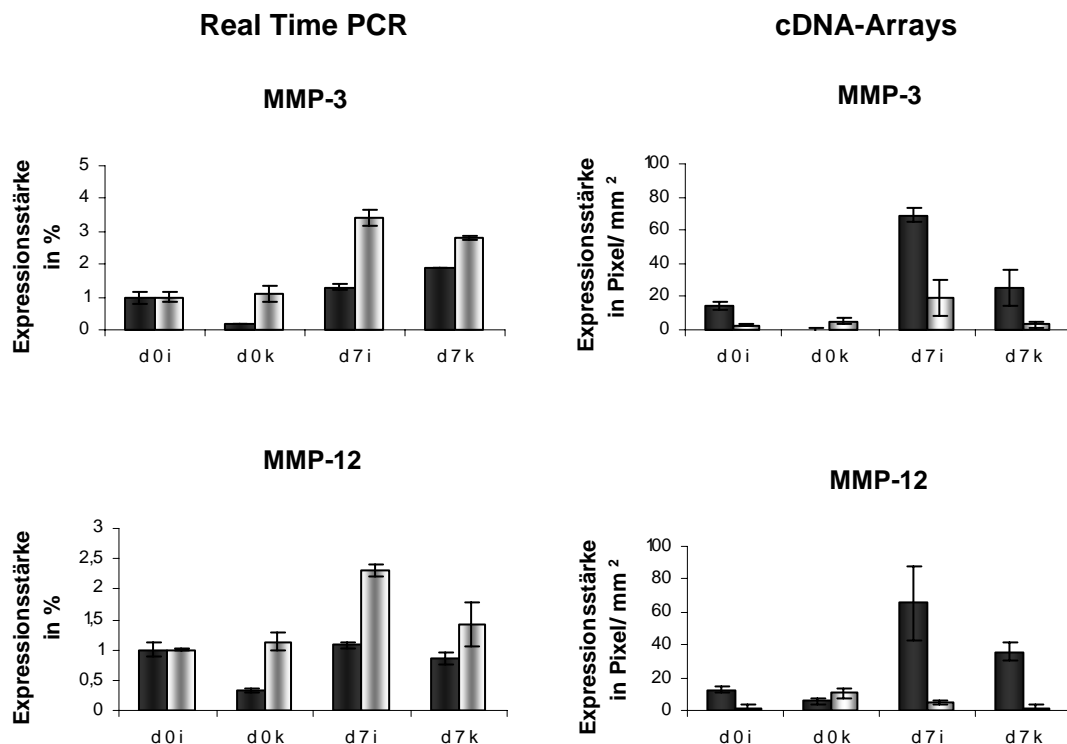
**Zusammenfassung**

Mit der Methode der Real Time PCR soll eine Aussage zur Validität der Ergebnisse gemacht werden, welche mit den cDNA-Arrays gewonnen werden. In einer geringen Zahl der Untersuchungen können die Ergebnisse bestätigt werden. Ausnahmen stellen MMP-12 und TIMP-3 dar, wobei keine der beiden Versuchsreihen anhand der Real Time PCR bestätigt werden konnte. In fünf von elf Untersuchungen wurde anhand der Real Time PCR in beiden Versuchsreihen ein entsprechendes Expressionsmuster nachgewiesen. In vier von elf Fällen konnte immerhin in einer Versuchsreihe das Ergebnis bestätigt werden. Das spricht für eine niedrige Validität der cDNA-Arrays. Dieses Ergebnis hätte allerdings mit mehr Praxis in der Hybridisierungstechnik als auch der Auswertung besser ausfallen können.

## 3.3.2 Real Time PCR-Analysen von RNA aus kultivierten Synoviozyten

**Vergleich der Ergebnisse der Real Time PCR-Analysen mit den entsprechenden cDNA-Array-Array-Ergebnissen für beide Versuchsreihen**

Die Daten der Analysen von RNA aus kultivierten Synoviozyten wurden ebenfalls per Real Time PCR überprüft und bestätigten im Vergleich teilweise die mit der Expressionsanalyse per cDNA-Arrays gewonnenen Daten.



**Abb. 35: Vergleich der Ergebnisse der Real Time PCR für MMP-3 und MMP-12 mit den Ergebnissen der cDNA-Array-Analysen für Zellkulturen von FLS am Tag 0 vor Arthritisinduktion und am Tag 7 nach Auslösen der AIA.**

■ = 1. Versuchsreihe, □ = 2. Versuchsreihe

d 0 i = FLS aus dem rechten (ipsilateralen) Kniegelenk am Tag 0 vor Arthritisinduktion,

d 0 k = FLS aus dem linken (kontralateralen) Kniegelenk am Tag 0 vor Arthritisinduktion,

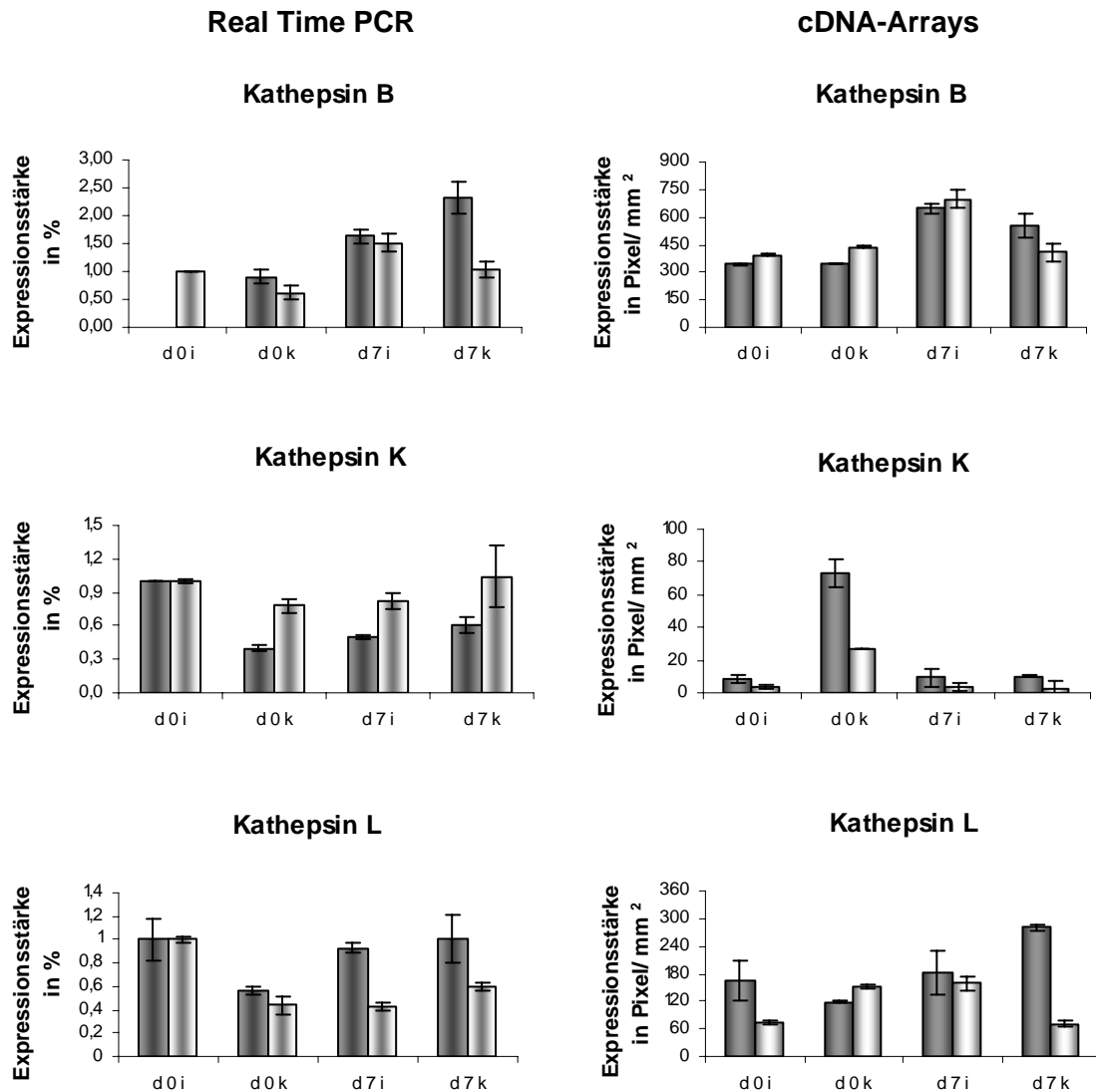
d 7 i = FLS aus dem rechten (ipsilateralen) Kniegelenk am Tag 7 nach Arthritisinduktion,

d 7 k = FLS aus dem linken (kontralateralen) Kniegelenk am Tag 7 nach Arthritisinduktion.

Die Darstellung der Ergebnisse der Real Time PCR erfolgt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in %, wobei der Bezug d 0 i = 1,0 ist. Die Darstellung der Ergebnisse der cDNA-Array-Untersuchungen erfolgt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in Pixel/mm<sup>2</sup>.

Für MMP-3 konnte in beiden Versuchsreihen eine Zunahme der Signalstärke für die am Tag 7 nach Arthritisinduktion gewonnenen FLS gezeigt werden. Auch auf der kontralateralen Seite des Kniegelenks der arthritiden Maus exprimieren FLS vermehrt MMP-3. Der Vergleich der Versuchsreihen untereinander bringt nur eine Übereinstimmung und zwar mit der Methode der cDNA-Arrays. Anhand der Real Time PCR zeigen sich Unterschiede am Übergang von der akuten in die chronische Phase der AIA bezüglich der MMP-3-Expression von ipsi- und kontralateralem Kniegelenk. MMP-12 zeigt in beiden Untersuchungsansätzen kein einheitliches Bild. Die Ergebnisse der cDNA-Array-Analysen können nicht mit den Untersuchungen durch Real Time PCR bestätigt werden. Selbst der Vergleich der beiden Versuchsreihen untereinander zeigt keinerlei Übereinstimmung. Da die FLS aus Zellkulturen von mindestens 5 Tieren stammen, kann man nicht von individuellen Schwankungen sprechen. Vielmehr scheinen die Synoviozyten bezüglich der MMP-12 Expression eine untergeordnete Rolle zu spielen.





**Abb. 36: Vergleich der Ergebnisse für Kathepsin B, K und L von Real Time PCR vs. cDNA-Arrays für Zellkulturen von FLS am Tag 0 vor Arthritisinduktion und am Tag 7 nach Auslösen der AIA.**

■ = 1. Versuchsreihe, □ = 2. Versuchsreihe

d 0 i = FLS aus dem rechten (ipsilateralen) Kniegelenk am Tag 0 vor Arthritisinduktion,

d 0 k = FLS aus dem linken (kontralateralen) Kniegelenk am Tag 0 vor Arthritisinduktion,

d 7 i = FLS aus dem rechten (ipsilateralen) Kniegelenk am Tag 7 nach Arthritisinduktion,

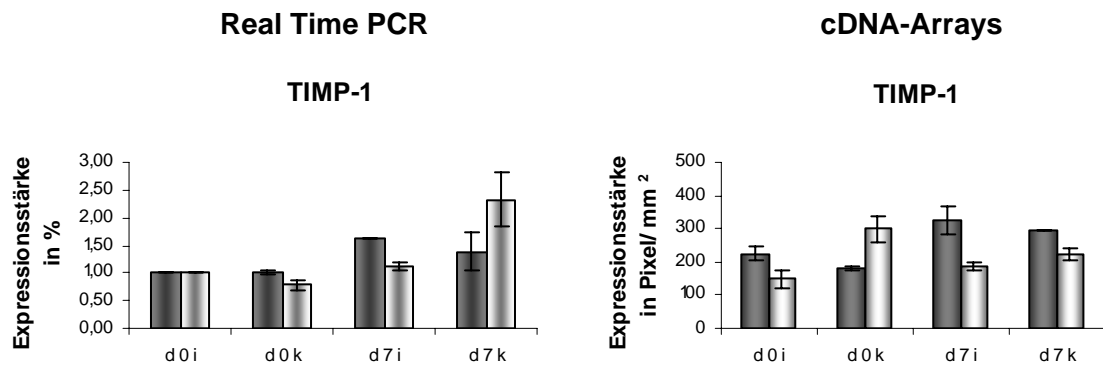
d 7 k = FLS aus dem linken (kontralateralen) Kniegelenk am Tag 7 nach Arthritisinduktion.

Die Darstellung der Ergebnisse der Real Time PCR erfolgt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in %, wobei der Bezug d 0 i = 1,0 ist. Die Darstellung der Ergebnisse der cDNA-Array-Untersuchungen erfolgt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in Pixel/ mm<sup>2</sup>.

Kathepsin B zeigt am Tag 7 nach Arthritisinduktion eine Zunahme der Signalstärke im betroffenen Kniegelenk. Die Ergebnisse der Real Time PCR ähneln denen der cDNA-Array-Untersuchungen. Auch auf der kontralateralen Seite kann in der ersten Versuchsreihe am Tag 7 nach Arthritisinduktion eine Zunahme der Signalstärke von Kathepsin B detektiert werden.

Für Kathepsin K zeigt sich kein eindeutiges Ergebnis. Während jede Untersuchungsmethode für sich das gleiche Ergebnis zeigte, kann untereinander kein identisches Ergebnis erzielt werden.

Kathepsin L spielt im Verlauf der AIA auf Transkriptionsebene scheinbar eine untergeordnete Rolle. Es konnte keine signifikante Änderung der Signalstärke nachgewiesen werden. Allerdings konnten die anhand der cDNA-Arrays ermittelten Ergebnisse der ersten Versuchsreihe mit der Methode der Real Time PCR exakt wiedergegeben werden.



**Abb. 37: Vergleich der Ergebnisse für TIMP-1 von Real Time PCR vs. cDNA-Arrays für Zellkulturen von FLS am Tag 0 vor Arthritisinduktion und am Tag 7 nach Auslösen der AIA.**

■ = 1. Versuchsreihe, □ = 2. Versuchsreihe

d 0 i = FLS aus dem rechten (ipsilateralen) Kniegelenk am Tag 0 vor Arthritisinduktion,

d 0 k = FLS aus dem linken (kontralateralen) Kniegelenk am Tag 0 vor Arthritisinduktion,

d 7 i = FLS aus dem rechten (ipsilateralen) Kniegelenk am Tag 7 nach Arthritisinduktion,

d 7 k = FLS aus dem linken (kontralateralen) Kniegelenk am Tag 7 nach Arthritisinduktion.

Die Darstellung der Ergebnisse der Real Time PCR erfolgt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in %, wobei der Bezug d 0 i = 1,0 ist. Die Darstellung der Ergebnisse der cDNA-Array-Untersuchungen erfolgt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in Pixel/ mm<sup>2</sup>.

TIMP-1 wird anscheinend nicht vordergründig von den FLS exprimiert. Zumindest implizieren die Ergebnisse der Untersuchungen von kultivierten Synoviozyten diese Vermutung. Einer geringen Zunahme der Signalstärke für MASC in der ersten Versuchsreihe steht keine differentielle Signalstärkenänderung für TIMP-1 in der zweiten Versuchsreihe gegenüber.

## Zusammenfassung

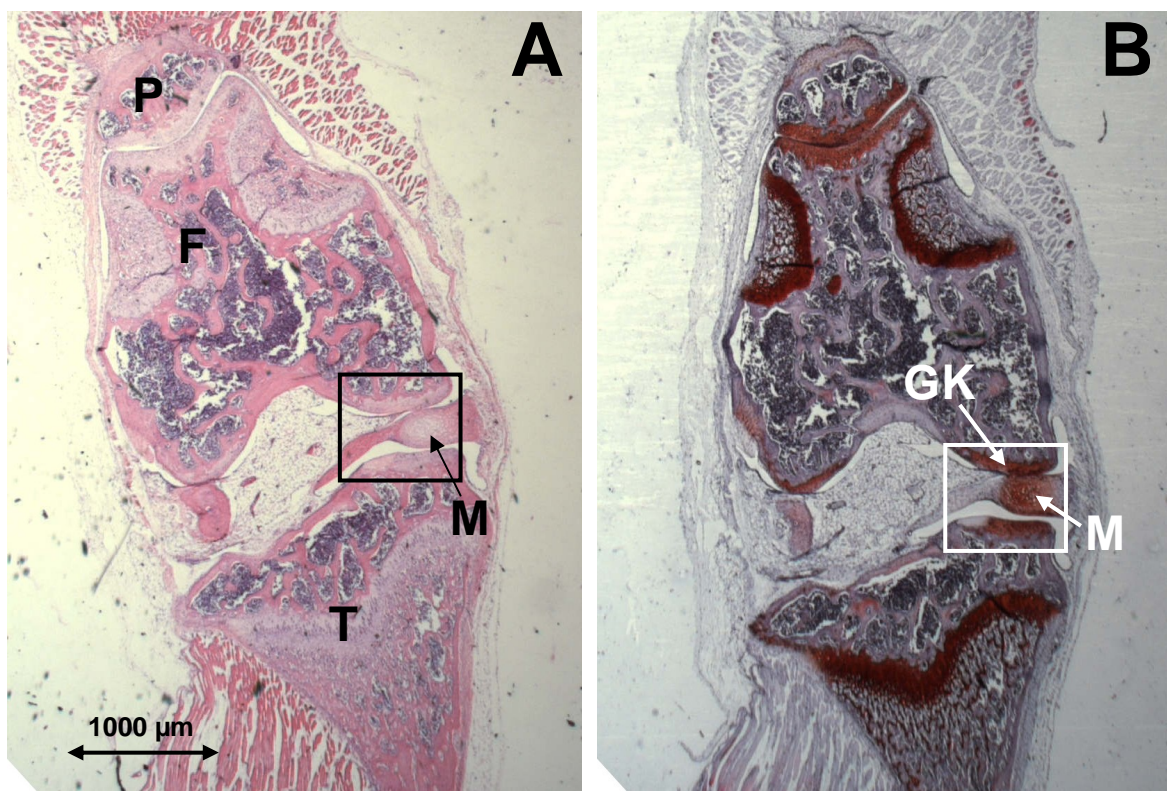
Die Untersuchungen von kultivierten FLS ergaben weniger positive Ergebnisse bezüglich Reliabilität als auch Validität der cDNA-Arrays als die Analysen von Gesamt-RNA aus Kniegelenken, was zum einen daran liegen kann, dass in dieser Versuchsreihe auch die FLS der kontralateralen Seite mit einbezogen wurden und zum anderen, dass weniger Proteinase untersucht wurden. Desweiteren wurde bezüglich der arthritischen FLS der Tag 7 nach Auslösen der AIA als Untersuchungszeitpunkt gewählt, welcher den Übergang der akuten in die chronischen Phase der Inflammation markiert und der in den erweiterten Experimenten der Real Time PCR weniger deutlich Signifikanzen bezüglich Tag 0 zeigte.

Am deutlichsten trat wieder MMP-3 hervor, welches eine Zunahme der Signalstärke mit beiden Untersuchungsmethoden und einer Übereinstimmung im Vergleich der beiden Methoden untereinander eine Hochregulation vermuten lässt. Danach folgt Kathepsin B, welches ebenfalls eine Überstimmung im Vergleich von Real Time PCR und cDNA-Arrays zeigt. Im Vergleich der Untersuchungsmethoden untereinander konnte anhand der cDNA-Arrays das Ergebnis wiederholt werden, was anhand der Real Time PCR nicht möglich war. Kathepsin K zeigt im Vergleich der einzelnen Untersuchungsmethoden unter sich jeweils ein ähnliches Ergebnis, welche aber im Vergleich der beiden Untersuchungsmethoden völlig verschieden sind. Kathepsin L und TIMP-1 zeigen eine Übereinstimmung der Ergebnisse von Real Time PCR und cDNA-Arrays, allerdings konnten die Ergebnisse untereinander weder mit cDNA-Arrays noch mit Real Time PCR bestätigt werden. MMP-12 zeigt keine eindeutig verwertbaren Ergebnisse.

## 3.4 Histologie

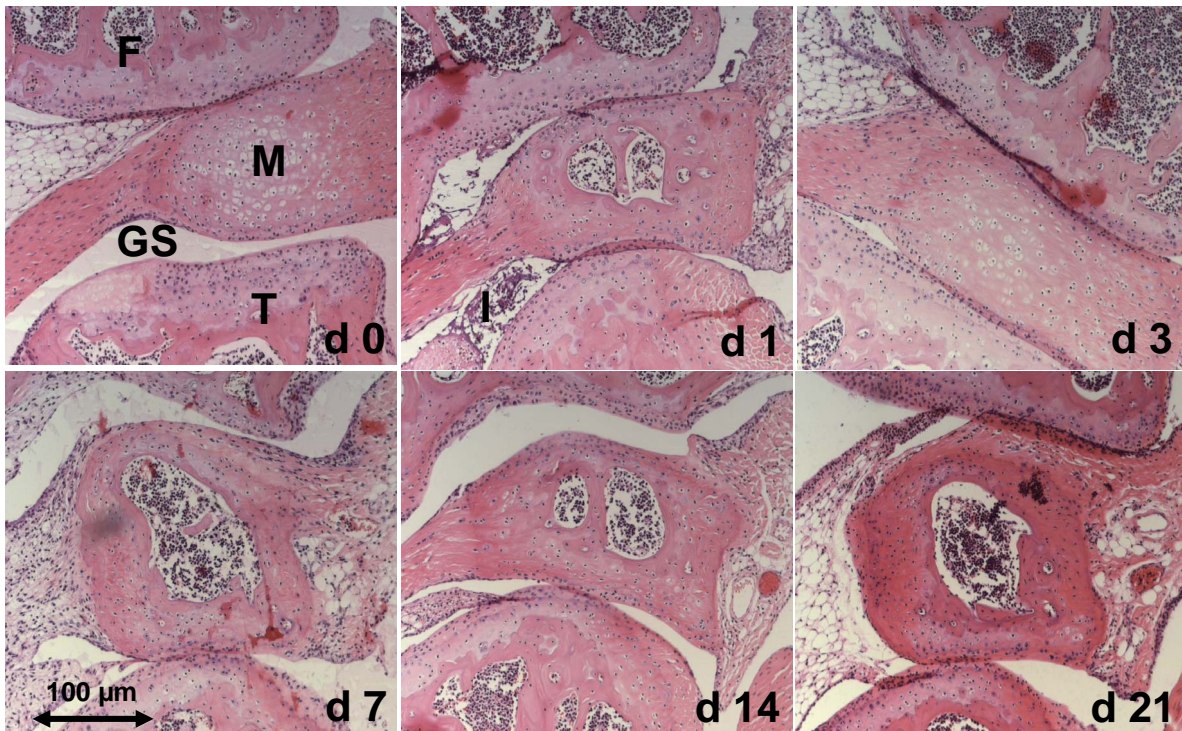
Sowohl die Histologie als auch die Immunhistochemie von MMP-3 erfolgte an Kniegelenken von C57Bl/6-Mäusen vor dem Auslösen der Arthritis (d0), in der akuten Phase (d1 + d3), im Übergang zur chronischen Phase (d7) und in der chronischen Phase (d14 + d21) der AIA. Die für die Immunhistochemie verwendeten Kniepräparate wurden von zwei Pathologen, unabhängig voneinander, histologisch in Bezug auf eine vorhandene Entzündung und Gewebedestruktion bewertet (Kap. 2.2.4.1, Abb. 9).

Die Beurteilung der akuten und chronischen Entzündung sowie der Knorpel- und Knochendestruktion erfolgte anhand der Hämatoxylin/Eosin (HE) und Safranin-O-Färbung. Eine Knorpeldestruktion stellt sich durch eine in ihrer Intensität verringerte Rotfärbung des Knorpels in der Darstellung der Safranin-O-Färbung dar. So konnte eine Knorpeldestruktion schon im frühen Stadium (d1) der AIA nachgewiesen werden, welche im weiteren Verlauf deutlich zunahm (Abb. 39).

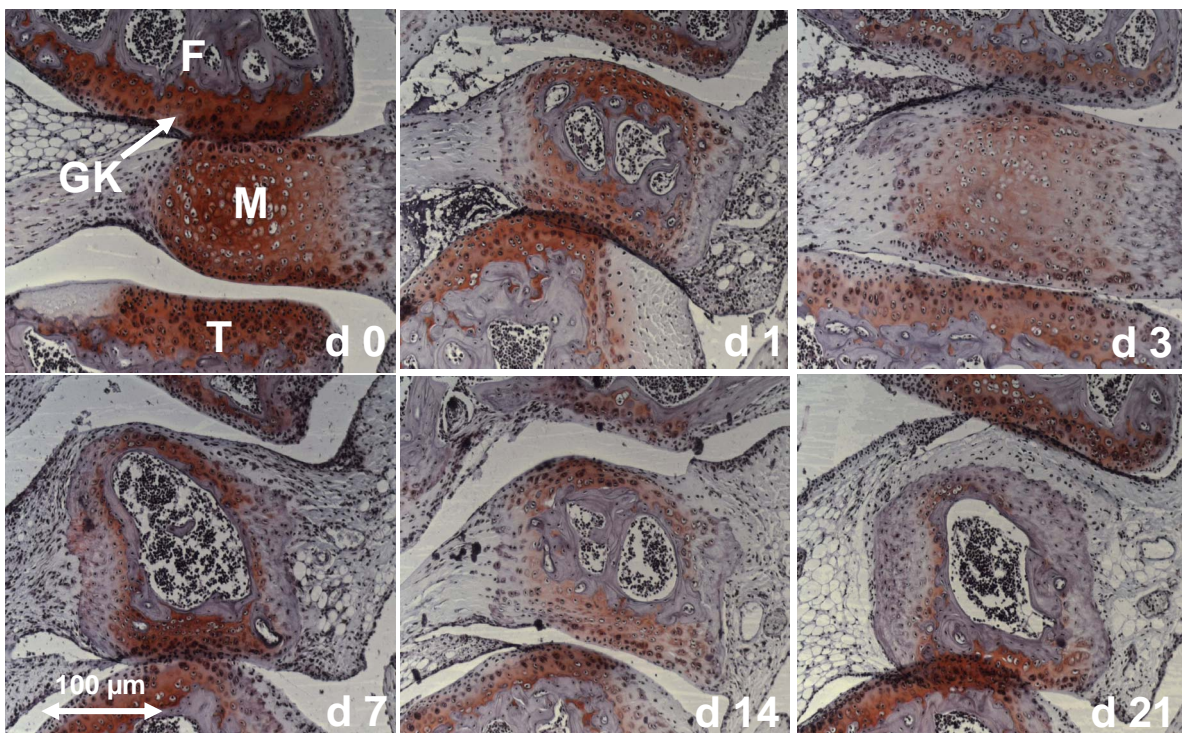


**Abb. 38: Histologie des Kniegelenks einer immunisierten Maus (C57/Bl6) am Tag 0 vor Arthritisinduktion.** A: Hämatoxylin/Eosin-Färbung zur Darstellung von Zellkernen (blau) und Zytoplasma (rosa). B: Safranin-O-Färbung zur Darstellung von Knorpel (rot). Die umrandeten Bereiche sind in Abb. 39 + 40 vergrößert dargestellt. F = Femur, GK = Gelenkknorpel, M = Meniskus, P = Patella, T = Tibia.

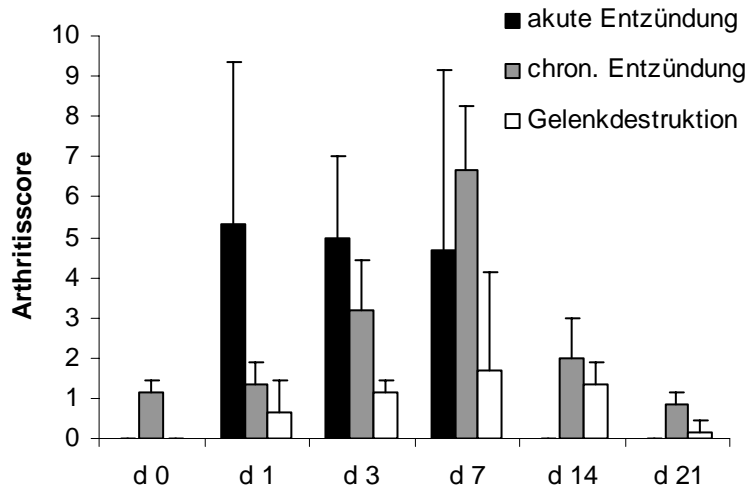




**Abb. 39: Gelenkhistologie zu verschiedenen Zeitpunkten der AIA.** Zur Bewertung der Entzündung und der Destruktion im Verlauf der AIA wurden Kniegelenkhistologien angefertigt (d 0: immunisierte Tiere vor Auslösung der AIA; d 1 + d 3: akute Phase; d 7: frühe chronische Phase; d 14 + d 21: chronische Phase). Die MW  $\pm$  SEM beruhen auf einer Anzahl von drei Tieren pro Gruppe (n=3). F = Femur, GS = Gelenkspalt, I = Infiltrat, M = Meniskus, T = Tibia.



**Abb. 40: Safranin-O-Färbung der Kniegelenke zur Darstellung des Knorpels zu verschiedenen Zeitpunkten der AIA.** F = Femur, GK = Gelenkknorpel, M = Meniskus, T = Tibia.



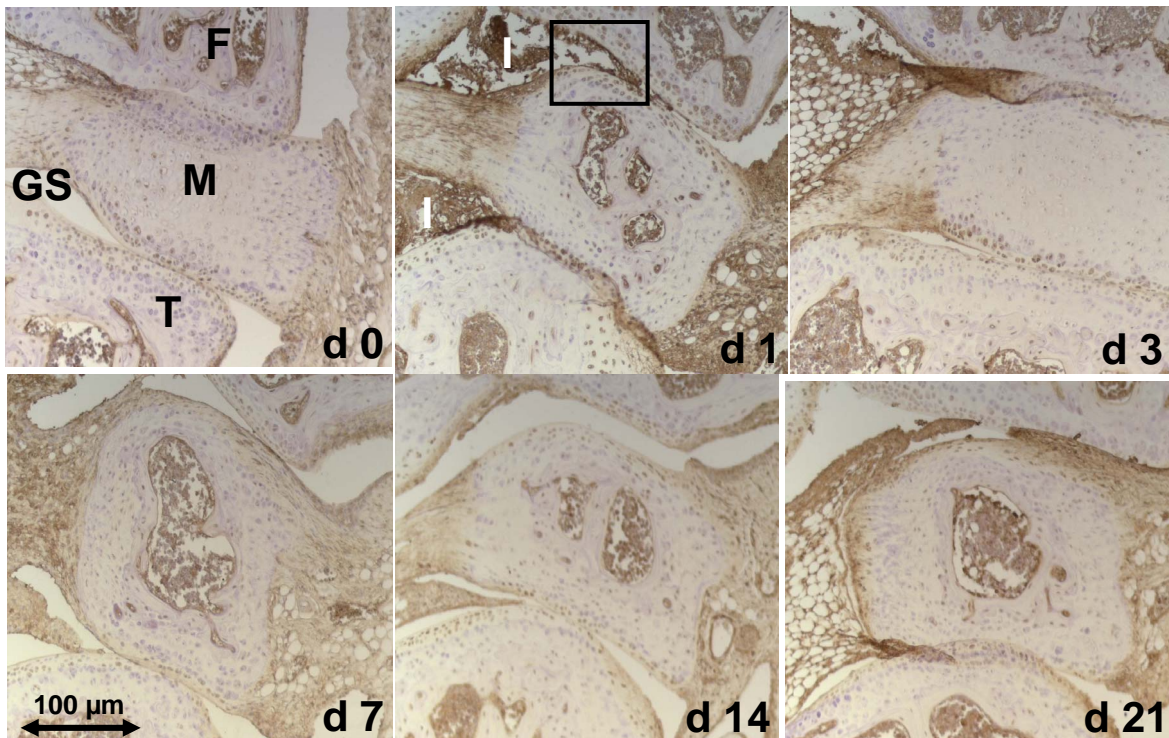
**Abb. 41: Histologische Bewertung der akuten und chronischen Entzündung sowie der Gelenkdestruktion im Zeitverlauf von Tag 0 - Tag 21 der AIA.** Die Berechnung erfolgte anhand des Arthritiscores und ist dargestellt als Mittelwerte + SEM einer repräsentativen Studie von 3 Tieren pro Gruppe. Aufgrund der Tieranzahl ist statistische Bewertung anhand des MANN - WHITNEY - Test nicht möglich.

Anhand der Darstellung in Abb. 41 ist zu erkennen, dass die akute Entzündung in den ersten Tagen nach dem Auslösen der AIA am deutlichsten in Erscheinung tritt. Sogar im Übergang zur chronischen Phase der AIA sind noch Zeichen der akuten Entzündung zu verzeichnen. Die chronische Entzündung ist am Tag 7 nach Arthritisinduktion am stärksten ausgeprägt, um im weiteren Verlauf wieder an Intensität zu verlieren. Zeichen der Gelenkdestruktion sind sofort am Tag 1 nach Beginn der AIA zu erkennen und nehmen im weiteren Verlauf der AIA zu. Die Zeichen der chronischen Entzündung am Tag 0 vor dem Auslösen der Arthritis könnten Ausdruck einer Reaktion auf die Immunisierung sein. Somit müsste man die Ergebnisse in Bezug auf die chronische Entzündung kritischer betrachten und vielleicht prozentual in Bezug auf die Ergebnisse am Tag 0 vor dem Auslösen der AIA darstellen.

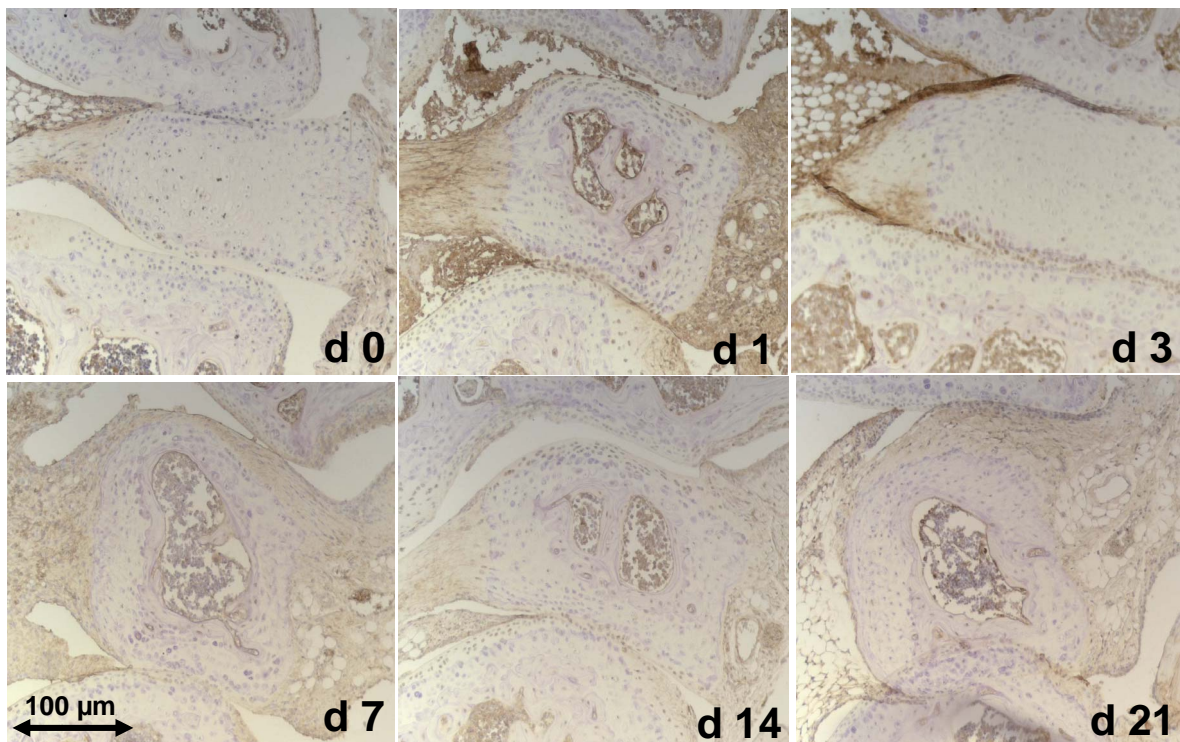
### 3.5 Immunhistochemie von MMP 3

Zur Lokalisierung des zellulären Ursprungs der differentiellen Expression von MMP-3 wurde eine dritte Methode herangezogen. Mittels Immunhistochemie wurde anhand von mit Antikörpern behandelten Paraffinschnitten versucht, die erhöhte Expression von MMP 3 den residenten als auch den eingewanderten Zellen zuzuordnen. Allerdings gestaltete sich schon die Suche nach einem speziellen Antikörper, der zur Untersuchung am Mausmodell geeignet ist als schwierig. Die Immunhistochemie von MMP-3 erfolgte schließlich mit primären monoklonalen Maus-AK der Firma Oncogen Research Products auf Mausgewebe, da keine in einer anderen Spezies hergestellten AK kommerziell erhältlich waren. Eine israelische Arbeitsgruppe der Universität Haifa unter der Leitung von E. Livne erzielte mit diesen Antikörpern zur Beurteilung der Expression von MMPs in Gelenkgewebe von Mäusen aussagekräftige Ergebnisse (Gepstein et al., 2002). Die immunhistochemische Färbung von MMP-3 ist allerdings nicht absolut spezifisch, die Färbung ist aber im Vergleich zur Isotypkontrolle gut erkennbar und unter Berücksichtigung der versuchsbedingten Vorgehensweise verwertbar. Es ist zu erkennen, dass in der akuten Phase der AIA am Tag 1 als auch am Tag 3 eine deutliche Färbung im artikulären Bereich des Knorpels erkennbar ist, was einer erhöhten Expression von MMP 3 entspricht. Es ist aber auch eine erhöhte Färbung in den einwandernden Zellen des Infiltrates erkennbar, was darauf schließen lässt, dass auch diese Zellen an der erhöhten Expression von MMP 3 beteiligt sind.

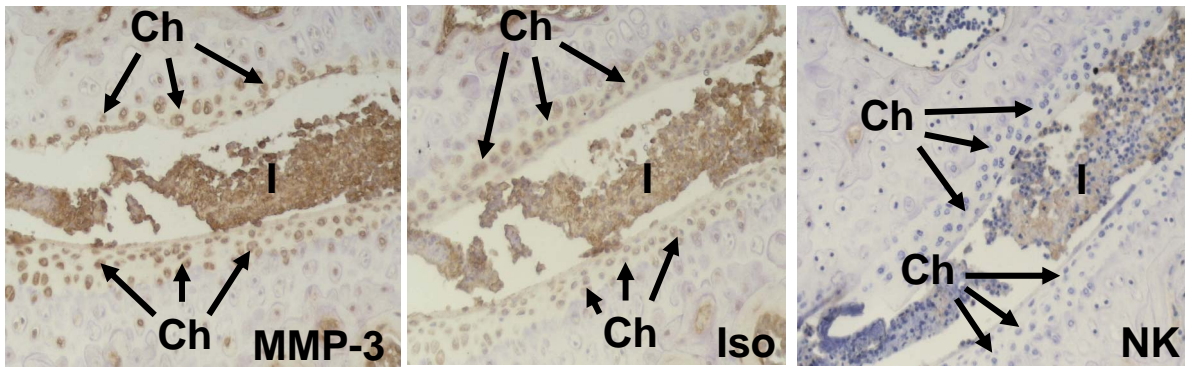




**Abb. 42: Immunhistochemie von MMP-3 zu verschiedenen Zeitpunkten der AIA.** Der umrandete Bereich ist in Abb. 44 vergrößert dargestellt. F = Femur, GS = Gelenkspalt, I = Infiltrat, M = Meniskus, T = Tibia.



**Abb. 43: Isotypkontrolle der Immunhistochemie von MMP-3 zu verschiedenen Zeitpunkten der AIA.**



**Abb. 44: Immunhistochemie von MMP-3. Darstellung der Chondrozyten-Färbung am Tag 1 nach Arthritisinduktion im Vergleich zu Isotyp- und Negativkontrolle. Ch = Chondrozyten, I = Infiltrat.**

FLS zeigten keine eindeutige Färbung, verglichen mit der Isotypkontrolle. Dies wurde wahrscheinlich durch die verwendeten Maus AK hervorgerufen. Die immunhistochemische Färbung von MMP-3 war in Chondrozyten dagegen viel stärker.

MMP-3 wurde in Chondrozyten zu den untersuchten Zeitpunkten (d0, d1, d3, d7, d14, d21) im Vergleich zu der jeweils mitgeführten Isotypkontrolle exprimiert (Abb. 42 und 43). Die MMP-3-Expression in Chondrozyten war in der akuten Phase (d1 > d3) stark erhöht, im Vergleich zur Expression vor dem Auslösen der AIA (d0). Die MMP-3-Expression in der frühen chronischen (d7) und der chronischen Phase (d14 + d21) war, verglichen mit der akuten Phase (d1 + d3) verringert.

## 4 Diskussion

Proteinasen spielen in einer Vielzahl von biologischen als auch pathologischen Prozessen wie beispielsweise Entzündung und koronarer Herzerkrankung eine entscheidende Rolle. Auch in der Karzinomentstehung und -ausbreitung, sowie in Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis sind proteolytisch wirkende Enzyme maßgeblich beteiligt. Als Ursache kann hierbei vor allem eine gestörte Balance zwischen aktivierten Proteinasen und ihren endogenen Inhibitoren angesehen werden (Iwata et al., 1995; Yoshihara et al., 2000; Martel-Pelletier et al., 1994). Deshalb ist es von großer Bedeutung, die Mechanismen zur Kontrolle dieser Balance zu erforschen bzw. die Ebene (Aktivierung, Expression, Kompartimentalisation) der gestörten Proteolyse zu identifizieren (Lokeshwar et al., 1993; Bramhall et al., 1997; Dugernier et al., 2005).

Der Mikroarray-Technologie kommt in der Analyse von komplexen Erkrankungen eine besondere Schlüsselstellung zu. Mit ihrer Hilfe konnte schon eine Vielzahl von Zusammenhängen in der Pathogenese von Krankheiten verständlich gemacht werden (Takahara et al., 2006; Henrickson et al., 2007; Miao et al., 2007).

Im Falle der RA wurden sowohl Kathepsinen als auch MMPs bereits mehrfach eine entscheidende Rolle beim Abbau der Gelenkstrukturen zugesprochen (Kaneko et al., 2001; Goldring et al., 2003). Vor allem MMP-3 scheint bezüglich der initialen Matrixdegradation eine besondere Schlüsselstellung einzunehmen. Auch in anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wie Morbus Bechterew und Psoriasisarthritis wurden häufig erhöhte Serumkonzentrationen von MMP-3 nachgewiesen (Keyszer et al., 1999; Chen et al., 2006). Am Beispiel der MMP-3-/-Maus konnte gezeigt werden, dass MMP-3 in der AIA ein großer Anteil am initialen Prozess des Knorpelabbaus zukommt (van Meurs et al., 1999). Im Modell der AIA waren in MMP-3-/-Mäusen keinerlei Knorpeldestruktionen nachweisbar. Ob MMP-3 dabei direkt auf Kollagen einwirkt oder indirekt durch Aktivierung anderer Proteinasen, wie beispielsweise MMP-9 ist noch nicht völlig geklärt.

#### 4.1 Kritik des experimentellen Design

cDNA Arrays stellen ein nützliches Instrument zur Untersuchung der Expression einer Vielzahl von Genen dar. Mittlerweile sind Protein-, Antikörper- und RNA-Arrays erhältlich. Gegenstand dieser Arbeit war jedoch die Entwicklung eines cDNA-Array für murine Proteinasen. Dabei unterscheidet man bezüglich der DNA-Arrays zwischen Arrays von hoher und geringer Dichte, es existieren vordefinierte Arrays für einen hohen Durchsatz an zu untersuchenden Genen, als auch Custom-made Arrays, die von den Firmen speziell nach den Wünschen des Käufers angefertigt werden. In dieser Arbeit steht ein solcher Custom-made Array im Mittelpunkt des Interesses.

Nach eingehender Internetrecherche wurde eine Liste von murinen Proteinasen und ihren Inhibitoren als auch Housekeeping-Genen zusammengestellt, die auf einem Array vereint, zur Untersuchung von einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen im tierexperimentellen Modell herangezogen werden kann. Anschließend wurde aus Mausgewebe unterschiedlichster Herkunft RNA zur Gewinnung der gewünschten Proteinase und Inhibitoren extrahiert, um nach einem aufwendigen Procedere die entsprechende Sequenz in Form von cDNA vorliegen zu haben. Nach der Herstellung eines Arrays mit den entsprechenden cDNAs wurde der Array zur Untersuchung von Expressionsprofilen im Modell der AIA eingesetzt, um sich ein Bild von der Validität und Reliabilität der Arrays zu machen. Dazu wurden die gleichen Proben, welche zur Untersuchung mittels cDNA-Arrays eingesetzt wurden, einer Analyse per Real Time PCR unterzogen. Durch den Vergleich der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass noch einige Verbesserungen bei der Entwicklung der cDNA Arrays, als auch bei der Hybridisierung notwendig sind, bevor man aussagekräftige Ergebnisse von den cDNA-Arrays erwarten kann.

Zur Analyse des Expressionsmusters anhand von cDNA Arrays wurden zwei Untersuchungsansätze gewählt. Zum einen wurde eine Untersuchung von direkt aus dem Kniegelenk (*in vivo*) gewonnener RNA von jeweils einem Individuum durchgeführt und zum anderen wurde in einer weiteren Untersuchung das Expressionsprofil der mRNA aus Kulturen fibroblasten-ähnlicher Synoviozyten analysiert. Verschiedene Empfehlungen zu Genexpressionsanalysen (Grant et al., 2002; Firestein & Pisetsky, 2002) raten zur Analyse homogener Zellgemische, da die ohnehin komplexe Auswertung und Datenverarbeitung besser mit der Transkription der Gene einer Zellpopulation in Zusammenhang gebracht werden kann. Andererseits verursacht eine Erkrankung wie die RA eine extensive Gewebeerstörung und nicht alle Arten von Zellen, die an diesem Prozess beteiligt sind wurden bis heute identifiziert. Es scheint also doch sinnvoll zu sein, in manchen Experimenten das gesamte betroffene Gewebe zu untersuchen. So erhöht sich die



Wahrscheinlichkeit differentielle Genexpression in Zellen zu entdecken, die vielleicht auch unerwartet in den Pathogenesemechanismus der RA involviert sind (Rioja et al, 2004).

Die Untersuchungen der mRNA aus den Kniegelenken von C57/Bl6-Mäusen vor und nach dem Auslösen der AIA mittels cDNA Arrays zeigten eine Zunahme der Signalstärken von MMP-3 und TIMP-1, welches sowohl untereinander als auch mit einer weiteren unabhängigen Methode bestätigt werden konnte. In den Untersuchungen der mRNA aus kultivierten Synoviozyten mittels cDNA-Arrays konnte MMP-3 ebenfalls eine, allerdings nicht signifikante Zunahme der Signalstärke aufweisen. Die Untersuchungen mittels Real Time PCR bestätigten dieses Ergebnis. Alle weiteren untersuchten Proteinase und Inhibitoren wiesen entweder kein eindeutiges Ergebnis bezüglich der Veränderung der Signalstärken auf oder das Ergebnis konnte anhand der Real Time PCR nicht verifiziert werden. Mögliche Ursachen der unterschiedlichen Ergebnisse der cDNA Array-Analysen könnten systemische Fehler, wie unsachgemäße Handhabung um Umgang mit den Arrays, ein Fehler in der Vielzahl der Schritte im Hybridisierungsvorgang und der anschließenden Entwicklung der Membranen.

Abb. 46 listet die kritischen Faktoren während der einzelnen Phasen des Hybridisierungsprozesses vom Gewinnen der zu untersuchenden Probe bis hin zur Datenauswertung auf. Während diese Arbeit ihr Hauptaugenmerk der Optimierung der Gewinnung der zu untersuchenden RNA gewidmet hat, wurde die Arbeit bezüglich der Verbesserung eines Custom-made Array durch die Arbeitsgruppe um B. Wiederanders (Schüler et al., 2006) weiterverfolgt und viele der kritischen Faktoren während der Hybridisierung verbessert und sogar ausschaltet. Dies wurde zum einen mit in Kooperation mit der Firma Clondiag entwickelten Tube Array<sup>®</sup> als auch in der Optimierung des Labelling- und Hybridisierungsschrittes erreicht.

Mit der Entwicklung des Tube Array<sup>®</sup> konnte schon allein durch das Format eine Vielzahl an möglichen Fehlerquellen bezüglich der Hybridisierung und Waschprozedur minimiert werden. Mit der Realisierung der Miniaturisierung (lab-on-the-chip) präsentiert sich der Tube Array<sup>®</sup> mit einem wesentlich praktikablerem Format als die verwendeten 3,5 x 7,3 cm großen Nylonmembranen, mit welchen häufiger Probleme im experimentellen Ansatz wie homogenes Aufbringen der Hybridisierungslösung, möglicher Verlust von Hybridisierungs- oder Waschlösung, effektives Durchmischen, Austrocknungseffekte und das Einhalten einer konstanten Temperatur auftraten. Die Verwendung des Tube Array<sup>®</sup> erfordert im Vergleich zu den Membranen einen wesentlich geringeren Zeitbedarf und eine geringere Menge an Reagenzien.

---

**Ausgangsmaterial: RNA**

---

Stabilität  
RNase freies Arbeiten  
Menge

---

---

**Reverse Transkription**

---

Stabilität  
RNase freies Arbeiten

---

---

**Mikroarray Plattform**

---

Homogenität der Spots  
Homogenität der Oberfläche  
Sondenspezifität

---

---

**Farbstoffe (Fluoreszenz)**

---

Unterschiedliche Einbauraten der Farbstoffe  
Unterschiedliche Signalintensitäten der Farbstoffe  
Stabilität der Farbstoffe

---

---

**Aufbringen der Hybridisierungslösung**

---

Luftblasen  
Verlust der Lösung

---

---

**Hybridisierung**

---

Konstante Temperatur  
Effektives Durchmischen  
Austrocknungseffekte

---

---

**Datenanalyse**

---

Normalisierung der Daten  
Kontrolle des Experiments

---

**Abb. 45: Auflistung der kritischen Faktoren in einem Standard Genexpressions DNA-Mikroarray-Experiment.** modifiziert nach [www.eppendorf.com/script/binres.php](http://www.eppendorf.com/script/binres.php)

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es wichtig ist, zu welchem Zeitpunkt die Nukleinsäure markiert wird. Es zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich der Signalstärke und Differenzierung der einzelnen Spots für die Markierung der RNA vor, während oder nach der reversen Transkription. Am effektivsten erwies sich die Synthese von doppelsträngiger DNA durch reverse Transkription von Gesamt-RNA und anschließender Markierung durch den Einbau von Biotin-gelabelten dUTP während einer linearen Amplifikation unter Verwendung eines SPA-Primers (Schüler et al., 2006). Dazu wurde ein spezielles Amplifizierungsprotokoll entwickelt, welches nach der cDNA-Synthese die Generierung von antisense-orientierter einzelsträngiger DNA vorsieht, da die sense-Sequenz auf dem Tube Array<sup>®</sup> immobilisiert ist. Dazu wurde ein Primermix eingesetzt, der für jede Oligonukleotidsequenz einen eigenen Primer enthält.

Ebenfalls von Bedeutung ist die Menge an eingesetztem Primer, welche so gering wie möglich sein sollte, um falsch-positive Ergebnisse oder Kreuzhybridisierungen zu minimieren. Das wurde unter Kenntnis eines zu erwartenden Spots die Primermenge identifiziert, bei welcher gerade noch ein Signal erscheint.

Der Tube Array<sup>®</sup> unterscheidet sich noch in einigen weiteren wesentlichen Punkten von den cDNA-Arrays, da die einfache Übertragung des bestehenden Protokolls zur Fertigung und Hybridisierung der Membran-cDNA-Arrays auf Glasobjektträger nicht möglich war. Daher wurde ein DNA-Oligonukleotid-Array entwickelt, das einige Vorteile gegenüber den Membran-Arrays aufweist. Es wurden mit Hilfe bioinformatischer Unterstützung zwei Oligonukleotidsequenzen pro Gen ausgewählt, wobei sich eine Sequenz nahe am Poly-A-Ende des Gens befinden sollte. Die Verwendung von zwei Sequenzen pro Gen dient der Reduzierung falsch-positiver Ergebnisse, da nur Signalstärkeänderungen von beiden Sequenzen weiterverfolgt werden. Die Quantifizierung erfolgt dann mit der nahe am Poly-A-Ende positionierten Oligonukleotidsequenz, da die Transkription dort am effizientesten verläuft. Drei zusätzlich gespottete externe Kontrollen dienen der Verfolgung von Probenpräparation, Hybridisierung und Detektion und bilden eine Positivkontrolle des Hybridisierungsexperiments. Durch die kommerzielle Synthese der Oligonukleotide entfiel der erhebliche Arbeitsaufwand zur Generierung von ausreichend Material zum Spotten. Ein weiterer Vorteil bietet die computergestützte Auswertung der Signale. Dabei werden die Transmissionen in zeitlicher Abhängigkeit zur Verfolgung der Entwicklung der Hybridisierungssignale gemessen und ermöglichen damit die Auswertung des Array zu jedem Zeitpunkt des Experiments.

Die Qualität der Expressionsdaten hängt hauptsächlich von der Spezifität der Hybridisierungsdaten ab. Deshalb ist es extrem wichtig Kreuzhybridisierungen auszuschließen, was sich bei dieser Arbeit auf einen theoretischen Abgleich der Primer mit

der Datenbank Blast-search ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) beschränkte und damit praktisch nicht intensiv genug verfolgt wurde. Wenn ein Primer laut der Datenbank auch für ein anderes Gen kodierte, wurde er für das Primerdesign ausgeschlossen. Häufig wird mit der Wiederholung von Hybridisierungen und Replikaten der Proben auf dem Array versucht die Zuverlässigkeit von Genexpressionsprofilen zu demonstrieren. Doch auch hier können spezielle Sequenzen und räumliche Strukturen der Proben Artefakte hervorrufen, die durchaus auch reproduzierbar sind. Hier kann man sich das Wissen zunutze machen, dass der Komplex aus immobilisierter Probe und Zielsequenz stabiler ist, als ein durch Kreuzhybridisierung entstandener DNA-Duplex (Fotin et al., 1998) und versuchen durch eine erhöhte Stringenz der Waschprozedur, das Auftreten von Kreuzhybridisierungen zu minimieren. Es existieren mittlerweile Methoden anhand derer man die Qualität jeder einzelnen immobilisierten Probe auf einem DNA-Chip in Abhängigkeit von der hybridisierten komplexen gesamt-RNA evaluieren kann (Drobyshev et al., 2003).

Insgesamt wurde gezeigt, dass die Arrays zum Zeitpunkt der Hybridisierungsexperimente noch nicht so aussagefähig waren, wie es wünschenswert gewesen wäre. So konnten die Ergebnisse, welche mittels Real Time PCR bestimmt wurden, selten die cDNA-Array-Analysen bestätigen. Deshalb wurde die Weiterentwicklung des Arrays daraufhin optimiert, ein mit den Real Time PCR-Daten vergleichbares Ergebnis zu erzielen.

#### 4.2 Beurteilung der Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchungen

Tabelle 16 gibt einen Überblick über die Wiederholbarkeit und Gültigkeit der mittels cDNA-Arrays und Real Time PCR erhobenen Daten bezüglich der differentiellen Expression von Proteinasen und Proteinaseinhibitoren im arthritischen Kniegelenk von Mäusen mit AIA. Man kann erkennen, dass die Ergebnisse für MMP-3, Kathepsin L und TIMP-1 sowohl mit den cDNA-Arrays reproduziert und als auch mit Real Time PCR bestätigt werden konnten.



**Tab. 16: Vergleich der Versuchsreihen untereinander und der Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungsmethoden für *in vivo*-Analysen.** + bedeutet komplette Übereinstimmung für alle Untersuchungspunkte, - bedeutet Abweichung von mindestens einem Untersuchungspunkt.

Proteinase	Reproduzierbarkeit - Vergleich beider Versuchsreihen		Gültigkeit - Vergleich von cDNA-Arrays & Real Time PCR	
	cDNA-Arrays	Real Time PCR	1. Versuchsreihe	2. Versuchsreihe
MMP-2	-	-	-	+
MMP-3	+	+	+	+
MMP-9	-	+	-	+
MMP-12	+	-	-	-
Kath. B	+	+	-	-
Kath. K	-	-	-	-
Kath. L	+	+	+	+
Kath. S	-	-	+	+
TIMP-1	+	+	+	+
TIMP-3	-	-	-	-
Stef. 2	-	+	+	-

#### 4.2.1 Matrixmetalloproteinasen *in vivo*

MMPs zeigten in den Untersuchungen auf mRNA Ebene die deutlichsten Veränderungen. Eine gesteigerte MMP-Aktivität korreliert deutlich mit einer gesteigerten Genexpression (Bewsey et al, 1996). Besonders für MMP-3 konnten in den meisten Untersuchungen signifikante Ergebnisse ermittelt werden. Sowohl die Ergebnisse der cDNA-Arrays als auch die per Real Time PCR ermittelten Daten zeigten eine gesteigerte Expression von MMP-3 am Tag 3 nach Arthritisinduktion auf mRNA-Ebene. Dieses Ergebnis festigt die Vermutungen, dass MMP-3 in der RA eine Schlüsselrolle in der Knorpeldegradation einnimmt. Ergebnisse von Untersuchungen der AIA, der CIA und der ZIA in MMP-3-defizienten und -sukzessiblen Mäusen können diesen Verdacht erhärten (Van Meurs et al., 1999). MMP-3 scheint dabei aber nicht nur durch die direkte Lyse des Kollagens im rheumatischen Geschehen involviert zu sein, sondern ist auch in der Lage andere Proteinase zu aktivieren (Ogata et al., 1992). Yoshihara et al., 2000 zeigten in der Synvialflüssigkeit von Patienten mit RA eine deutlich höhere MMP-3-Aktivität vor allem auch in den frühen Stadien. MMP-3 stellt ein positives Beispiel für die Reliabilität und die Validität

der cDNA Arrays dar, da die Ergebnisse in den jeweils zwei Versuchsreihen bzw. im Vergleich der beiden Methoden untereinander immer in der gleichen Deutlichkeit wiederholt werden konnten. Das lag unter anderem auch daran, das MMP-3 am Tag 0 vor Arthritisinduktion durch die Arrays nicht detektiert werden konnte und im weiteren Verlauf eine deutliche Zunahme der Signalstärke aufzeigte. Im erweiterten Expressionsprofil der Real Time PCR blieb MMP-3 im weiteren Verlauf der Arthritis zwar nicht so deutlich wie in der akuten Phase aber doch signifikant im Expressionsniveau erhöht (s. Abb. 32).

Für MMP-9 konnte anhand der cDNA Arrays kein einheitliches Bild ermittelt werden. Es zeigte sich sowohl gesteigerte als auch verminderte Signalstärken im Verlauf der Arthritis. Mittels Real Time PCR konnte eine Herunterregulation der mRNA in der akuten Phase der Arthritis dargestellt werden, was dem Bild der vermehrt exprimierten MMPs zur Initialisierung und Fortführung des Knorpelabbaus widerspräche. Außerdem konnte in murinen arthritischen Kniegelenken nach Entwicklung einer experimentellen Arthritis ein erhöhter MMP-9-Proteingehalt nachgewiesen werden (Schurigt et al., 2005). Ein parakriner Stimulus zur Freisetzung von MMP-9, der das ermittelte Ergebnis und damit die Diskrepanz zwischen verminderter MMP-9 Expression auf mRNA-Ebene und gesteigertem MMP-9-Proteingehalt erklären könnte, wurde von Dreier et al, 2001 publiziert. In Untersuchungen der humanen RA auf Proteinebene konnte allerdings ein ähnliches Ergebnis für MMP-9 verzeichnet werden. Niedrigen Leveln in einem frühen Stadium der RA folgte ein Anstieg im weiteren Verlauf der Erkrankung (Yoshihara et al., 2000). Für die cDNA Arrays zeigt das Ergebnis, dass es für die Analyse von Proteinase, die bereits am Tag 0 vor Arthritisinduktion ein Signal aufweisen, schwierig ist zwischen einer weiteren Zu- oder Abnahme der Signalstärken zu differenzieren. MMP-12 ist auf den cDNA Arrays zu keinem Zeitpunkt sichtbar. Dieser Umstand erschwert die Auswertung mit der Software Scion Image. Die Spots werden manuell ausgewertet und trotz eines vorliegenden Musters ist es schwierig, die Bereiche zur Intensitätsmessung abzugrenzen. Dies führt zusammen mit einem weiteren methodischen Nachteil der entwickelten Arrays zu den irritierenden Ergebnissen für MMP-12. Der Hintergrund der Arrays ist nicht gleichmäßig und so entsteht der Eindruck, dass der Hintergrund intensiver ist als der Spot, was zu negativen Resultaten bei der Auswertung führte. Das kann durch methodische Fehler während der Hybridisierung begründet werden. Durch nicht zügiges Arbeiten während des Waschens (die Filter dürfen unter keinen Umständen antrocknen) oder unsachgemäßes Hantieren mit Pinzetten am Filter kann es zu Verfälschungen kommen.

Für MMP-2 kam dieser Fehler zumindest in der ersten Versuchsreihe ebenfalls zum Tragen. Hier konnte eine Hintergrundverfälschung bei der Analyse von mRNA vom Tag 0 nicht vom Spot abgegrenzt werden, was zu einem nicht aussagefähigen Ergebnis führte. Anhand der

Untersuchungen mit Real Time PCR zeigte sich für MMP-12 eine deutliche Expressionssteigerung ab Tag 1 nach Arthritisinduktion, welche im weiteren Verlauf erhalten blieb. MMP-2, welchem eine suppressive Wirkung im Verlauf entzündlicher Gelenkerkrankungen zugeschrieben wird (Itoh et al., 2002), zeigt eine entsprechend verminderte Expression am Tag 1 nach Arthritisinduktion, die im weiteren Verlauf wieder Ausgangsniveau erreichte und darüber hinaus noch weiter anstieg.

#### 4.2.2 Kathepsine *in vivo*

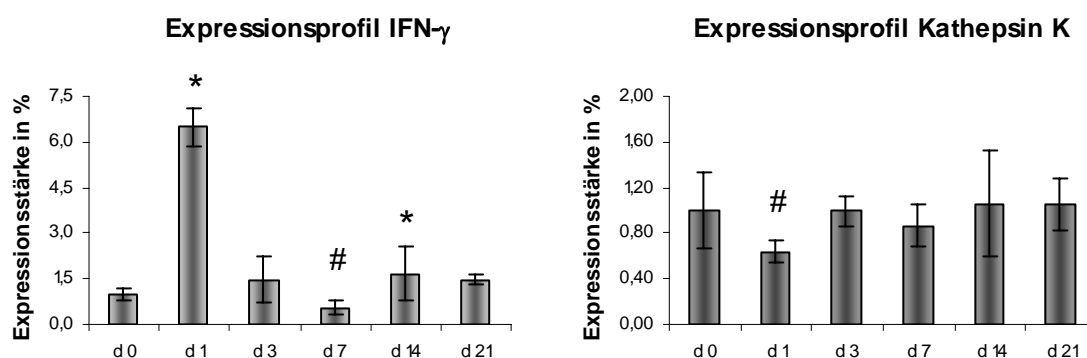
Auch die Kathepsine spielen in der RA bzw. AIA eine große, wenn auch nicht so bedeutende Rolle wie die Matrixmetalloproteinasen. Dies liegt möglicherweise am sauren pH-Wert, den Kathepsine für eine optimale Funktionsfähigkeit benötigen und der überwiegend nicht vorherrscht. Trotzdem konnte für mehrere Kathepsine ein elastin- und kollagendestruierendes Potential nachgewiesen werden (Kirschke et al., 1989; Brömme et al., 1993; Premzl et al., 2003). Vor allem Kathepsin B und L werden häufig als prognostische Marker bei den unterschiedlichsten Krankheitsbildern, überwiegend in der Onkologie eingesetzt (Budihna et al., 1996; Jedeszko & Sloane, 2004). Allerdings konnte für einige Cysteinproteinasen in der AIA noch kein genauer Wirkungsmechanismus identifiziert werden.

Kathepsin L und Kathepsin S zeigen in der akuten Phase der AIA am Tag 3 eine gesteigerte Expression. Dies weist auf eine entsprechende Beteiligung an den matrixdegradierenden Prozessen im Rahmen der AIA hin. Erfreulicherweise konnte bei diesen beiden Proteinasen das Ergebnis der cDNA-Array-Analyse durch die Methode der Real Time PCR auch im weiteren Verlauf der AIA relativ genau bestätigt werden (s. Abb. 33). Auch hier bestätigt sich der schon für MMP-3 erwähnte Umstand, dass Gene, die am Tag 0 vor Arthritisinduktion auf dem Array nicht sichtbar sind und im weiteren Verlauf eine Zunahme der Signalstärke zeigen, mit der Methode der cDNA-Arrays ein verlässliches Ergebnis zeigen.

Kathepsin B konnte überdurchschnittlich häufig in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA nachgewiesen werden (Lenarcic et al., 1988; Gabrijelcic et al., 1990). Durch die Aktivierung der fibrinolytischen Kaskade (Ikeda et al., 2000) und Aktivierung und Regulation von pro-MMP-3 (Yan & Sloane, 2003) kann Kathepsin B in die Entwicklung einer Arthritis eingreifen. Kathepsin B wurde im Verlauf der AIA nicht so deutlich differentiell exprimiert wie andere Cysteinproteinasen. Anhand der Real Time PCR wurde eine, allerdings nicht signifikante Steigerung der Genexpression an Tag 3, 14 und 21 ermittelt, was den cDNA-Array-Analysen entspricht. Die nur leichten Veränderungen auf mRNA-Ebene könnten durch eine Aktivierung der Translation von Kathepsin B und L in der RA (Keyszer et al., 1998)

erklärt werden.

Kathepsin K, welches überwiegend von Osteoklasten exprimiert wird, spielt im Knorpel- und Knochenabbau in der RA eine bedeutende Rolle. Kathepsin K-defiziente Mäuse zeigen im Verlauf der AIA eine weniger schwere Ausprägung von klinischen und histologischen Parametern wie Entzündung, Gelenkdestruktion und Knorpelabbau (Smago, 2005). Demzufolge wäre eine gesteigerte Expression von Kathepsin K zu erwarten. Im Gegensatz zu dieser Erwartung zeigte sich eine verminderte Expression von Kathepsin K in der akuten Phase der AIA mittels Real Time PCR. Kamolmatyakul et al., 2001 konnten zeigen, dass IFN- $\gamma$  die Expression von Kathepsin K auf mRNA- und Proteinebene herunterregulieren und die Bildung von Osteoklasten inhibieren kann. Dementsprechend zeigte eine Real Time PCR-Analyse von IFN- $\gamma$  eine zu Kathepsin K konträr gesteigerte Expression. Die signifikante Herunterregulation für Kathepsin K ist am Tag 1 nach Arthritisinduktion nachweisbar und hat sich am Tag 3 schon wieder dem Ausgangsniveau angeglichen. Offenbar sind die Zeitfenster in den cDNA-Array-Untersuchungen zu groß, um eine entsprechende Veränderung zu detektieren.

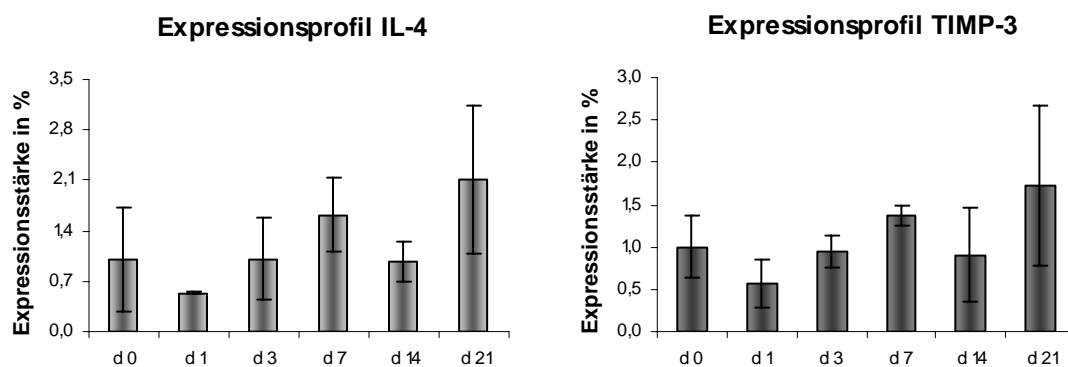


**Abb.: 46: Expressionsprofil von IFN- $\gamma$  und Kathepsin K von Tag 0 – Tag 21.** n=5 für d 0, d 3, d 14; n=3 für d 1, d 7, d 21. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in %, wobei der Bezug d 0 = 1,0 ist. Signifikante Veränderungen im Vergleich zum d 0 sind durch Sternchen (gesteigerte Expression) und Rauten (verminderte Expression) dargestellt [(#) / (\*) p  $\leq$  0,1; # / \* p  $\leq$  0,01; ## / \*\* p  $\leq$  0,01].

Die Ergebnisse, welche mit den cDNA-Arrays ermittelt wurden, konnten mit den Untersuchungen per Real Time PCR nur teilweise bestätigt werden (s. Abb. 30).

4.2.3 Inhibitoren *in vivo*

Eine deutliche Expressionssteigerung konnte für den spezifischen Inhibitor der MMPs TIMP-1 nachgewiesen werden. Ähnlich wie MMP-3 zeigt auch TIMP-1 sowohl auf den Arrays als auch in den Real Time PCR-Analysen eine Zunahme der Signalstärke am Tag 3 nach Arthritisinduktion, um sich anschließend wieder den Ausgangswerten am Tag 0 anzunähern. Desweiteren ist die vermehrte Expression nicht so ausgeprägt und erfolgt zeitlich auch etwas verzögert zur MMP-3-Expression. Hinsichtlich der Tatsache, dass die Real Time PCR-Untersuchungen die Ergebnisse der cDNA-Array-Analysen bestätigen konnten (s. Abb. 31), stellt auch TIMP-1 ein positives Beispiel für die Funktionalität der cDNA Arrays dar. TIMP-3 zeigt ebenfalls eine differentielle Expression allerdings ohne deutliche Signifikanzen. Interessanterweise ähnelt das in unseren wenigen Experimenten ermittelte Expressionsprofil von TIMP-3 exakt dem ermittelten Profil von IL-4. Ob die differentielle Expression von TIMP-3 mit derjenigen von IL-4 in Zusammenhang steht, wäre eine weiterführende Untersuchung wert. Für TIMP-2 konnte schon ein durch IL-4 induzierter Regulationsmechanismus in dermalen Fibroblasten nachgewiesen werden (Ihn et al., 2002). Einer solcher Zusammenhang wäre auch hier durchaus denkbar, ist in der Literatur aber noch nicht beschrieben worden.



**Abb.: 47: Expressionsprofil von IL-4 und TIMP-3 von Tag 0 – Tag 21.** n=5 für d 0, d 3, d 14; n=3 für d 1, d 7, d 21. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in %, wobei der Bezug d 0 = 1,0 ist. Signifikante Veränderungen im Vergleich zum d 0 sind durch Sternchen (gesteigerte Expression) und Rauten (verminderte Expression) dargestellt [(#) / (\*) p  $\leq$  0,1; # / \* p  $\leq$  0,01; ## / \*\* p  $\leq$  0,01].

Stefin 2 zeigt am Tag 3 nach Arthritisinduktion eine Zunahme der Signalstärke, was auf eine vermehrte Expression in der akuten Phase der AIA hindeutet. Dieses Ergebnis konnte nur teilweise bestätigt werden. In Bezug auf die RA bedeutet das Ergebnis, dass auch die Inhibitoren in der akuten Phase der Arthritis differentieLL exprimiert werden. Offensichtlich

scheint die vermehrte Expression von Stefin 2 diejenige der Proteinase nicht kompensieren zu können. Stefine (Typ-1-Cystatin) gehören zur Gruppe der intrazellulären Cysteinproteinase-Inhibitoren, die in der Lage sind, Cysteinproteinase vom Papaintyp zu inhibieren (Tsui et al., 1993).

#### 4.3 Beurteilung der Ergebnisse der Untersuchungen für kultivierte Synoviozyten

FLS sind maßgeblich am Entzündungsgeschehen, Neovaskularisierung und Gewebeproliferation in der RA beteiligt (Kasama et al., 2001; Perlman et al., 2001; Ospelt et al., 2004). Um dieses Ausmaß der Beteiligung der FLS an der differentiellen Expression von verschiedenen Proteinase zu untersuchen, wurden die mRNA aus Zellkulturen von arthritischen FLS der Untersuchung mit cDNA Arrays und Real Time PCR unterzogen. Durch verschiedene Signaltransduktionswege können FLS zur Freisetzung von Proteinase stimuliert werden, was sie in dieser Form auch von Gewebeproben von Patienten mit Osteoarthritis unterscheidet (Weis-Klemm et al., 2004). Auf den mit mRNA aus FLS hybridisierten cDNA-Arrays waren mehr Proteinase nachweisbar als auf den mit mRNA aus *in vivo*-Untersuchungsmaterial. Nach einer Stunde Expositionszeit waren auf den mit mRNA aus arthritischen Fibroblasten inkubierten Arrays 23 Gene sichtbar, während auf den mit mRNA der akuten arthritischen Phase hybridisierten Arrays 17 Gene zu sehen waren. Das kann verschiedene Ursachen haben.

Es muß beispielsweise bedacht werden, dass die Untersuchungen der FLS aus Zellkulturen durch die Kultivierung Interaktionen der FLS auf zellulärer als auch humoraler Ebene außer Acht lässt bzw. die Größenordnung der Beteiligung der einzelnen Gewebe an der Expression der Proteinase verzerrt dargestellt werden kann. Der aggressive tumorähnliche Phänotyp der FLS scheint eine einfache Reaktion auf die Anwesenheit von vermehrt sezernierten proinflammatorischen Zytokinen zu sein (Lee et al., 2007). Das heißt, möglicherweise spielen die FLS in der Gesamtheit der beteiligten Zellen und Strukturen eine größere Rolle in der differentiellen Expression einzelner Proteinase als in dieser Untersuchung gezeigt werden konnte, da die FLS zum Zeitpunkt der Untersuchung durch die Abwesenheit des zytokinreichen Milieus nicht mehr über die Merkmale des aggressiven Phänotyps verfügten. Tabelle 17 zeigt eine Übersicht über die Reproduzierbarkeit der mittels cDNA-Arrays und Real Time PCR erhobenen Daten zur differentiellen Expression von Proteinase und Proteinaseinhibitoren in Zellkulturen von FLS. Es wird deutlich, dass kein Ergebnis reproduziert und validiert werden konnte.

**Tab. 17: Vergleich der Versuchsreihen untereinander und der Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungsmethoden für Analysen von kultivierten FLS.** + bedeutet komplette Übereinstimmung für alle Untersuchungspunkte, - bedeutet Abweichung von mindestens einem Untersuchungspunkt.

	Reproduzierbarkeit - Vergleich beider Versuchsreihen		Gültigkeit - Vergleich von cDNA-Arrays & Real Time PCR	
	cDNA-Arrays	Real Time PCR	1. Versuchsreihe	2. Versuchsreihe
Proteinase				
MMP-3	-	+	-	+
MMP-12	-	-	-	-
Kath. B	+	-	-	+
Kath. K	+	+	-	-
Kath. L	-	-	+	-
TIMP-1	-	-	+	-

#### 4.3.1 Matrixmetalloproteinasen in kultivierten Synoviozyten

Nach der Untersuchung von aus Kniegelenken gewonnener mRNA wurde auch mRNA aus Zellkulturen von arthritischen FLS der Expressionsanalyse mittels cDNA-Arrays und Real Time PCR herangezogen. In dieser Untersuchung zeigte MMP-3 auf den Arrays und in den Real Time PCR-Untersuchungen nur in einer Versuchsreihe eine Signalstärkezunahme im arthritischen Kniegelenk. Es muß beachtet werden, dass die Entnahme und Kultivierung der arthritischen Fibroblasten am Tag 7 nach Arthritisinduktion erfolgte, das heißt, es kann eine Aussage über den Übergang von der akuten zur chronischen Phase gemacht werden. Während nun MMP-3 in den *in vivo*-Versuchen (siehe Kap. 3.3.1, Abb. 32) gerade am Tag 7 nach Arthritisinduktion keine Veränderung zeigte, konnte nun in den Untersuchungen von kultivierten Synoviozyten eine Änderung der Signalstärke nachgewiesen werden. Das könnte bedeuten, das FLS zwar an der differentiellen Expression von MMP-3 beteiligt sind, diese aber im Vergleich zu anderen Zellpopulationen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Tatsächlich scheinen hauptsächlich Chondrozyten und einwandernde Entzündungszellen für die gesteigerte Expression von MMP-3 verantwortlich zu sein (Bewsey et al, 1996). Doch auch andere Zellen wie Osteoklasten beispielsweise sind in der Lage sich veränderten Bedingungen anzupassen und können unter Umständen auch MMP-3 und MMP-12 synthetisieren (Andersen et al., 2004).

Für MMP-12 kann nach den Screeningtests keine Angabe zum Expressionsverlauf gemacht werden. Die Auswertung der cDNA-Arrays zeigt ein recht widersprüchliches Bild und auch die Analyse per Real Time PCR bringt keine neuen Erkenntnisse. Nach den erweiterten

*in-vivo*-Untersuchungen mittels Real Time PCR kann eine gesteigerte Expression für den gesamten Verlauf der Arthritis von Tag 1 bis Tag 21 einschließlich Tag 7 gezeigt werden. Das heißt, es müsste eine differentielle Expression für FLS nachweisbar sein, sofern sie in die Expression von MMP-12 involviert sind. Nach den uneinheitlichen Ergebnissen mit beiden Untersuchungsmethoden könnte man eine maßgebliche Beteiligung der FLS in der Expression von MMP-12 in Frage stellen. Meist wird die auch Makrophagenelastase genannte MMP-12 in pathologischen Prozessen von Makrophagen, dendritischen Zellen und Epithelzellen exprimiert (Bracke et al., 2005; Kerkela et al., 2002).

#### 4.3.2 Kathepsine in kultivierten Synoviozyten

In den Untersuchungen des Expressionsprofils für kultivierte Synoviozyten wurden Kathepsin B, K und L einer Analyse mit cDNA-Arrays und Real Time PCR unterzogen.

Die deutlichste Expressionänderung wurde für Kathepsin B detektiert. Nachdem schon die Ergebnisse der cDNA-Array-Auswertungen auf eine Beteiligung der FLS an der differentiellen Expression hinwiesen, konnte auch die anschließende Untersuchung der Proben mittels Real Time PCR eine Hochregulation am Tag 7 nach Arthritisinduktion sowohl auf der ipsilateralen als auch auf der kontralateralen Seite bestätigen. Schon in verschiedenen Studien konnte eine Freisetzung von Kathepsin B von FLS in der RA nachgewiesen werden (Keyszer et al., 1998; Mishiro et al., 2004). Dabei können verschiedene Faktoren zur Induktion eine Rolle spielen. Kathepsin K ist seit geraumer Zeit in den Fokus des wissenschaftliches Interesses geraten, da es eine große Rolle im Knochenremodelling während der RA spielen soll. Es wird hauptsächlich von Osteoklasten, aber auch von FLS gebildet (Hummel et al., 1998; Hou et al., 2002). Schon in den *in vivo*-Untersuchungen zeigte sich mit Ausnahme der verminderten Expression am Tag 1 nach Arthritisinduktion keine signifikante Expressionsänderung und auch in den Untersuchungen der mRNA von kultivierten Synoviozyten konnte kein eindeutiges Ergebnis ermittelt werden. Allerdings wurde mit den cDNA Arrays eine gesteigerte Expression von Kathepsin K in den FLS der kontralateralen Seite vor Arthritisinduktion detektiert. Dieses Ergebnis ließ sich anhand der Real Time PCR nicht bestätigen, so dass es sich um ein falschpositives Ergebnis handeln muß.

Kathepsin L zeigt in den Untersuchungen keine eindeutige differentielle Expression. In beiden Versuchsreihen und mit beiden Untersuchungsmethoden konnte weder eine gesteigerte noch eine verminderte Expression nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis widerspricht zumindest nicht den Ergebnissen der *in vivo*-Untersuchungen, denn auch dort war am Tag 7 nach Arthritisinduktion keine differentielle Expression nachweisbar.



#### 4.3.3 Inhibitoren in kultivierten Synoviozyten

Bezüglich der Untersuchungen der spezifischen Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 in den cDNA-Array-Untersuchungen keine Zu- oder Abnahme der Signalstärke aufweist. Auch in den Untersuchungen beider Versuchsreihen mittels Real Time PCR konnte kein signifikanter Anstieg der Expression des Inhibitors in der akuten Phase der Arthritis verzeichnet werden. Möglicherweise ist die Expression von TIMP-1 in FLS in der AIA vermindert, denn TIMP-1 wirkt nicht nur durch die direkte Inhibition von MMPs, sondern auch über eine Reduktion der Zellproliferationsrate (van der Laan et al., 2003), die letztendlich zum tumorähnlichen Wachstum der Synovialmembran und der Einwanderung von Entzündungsmediatoren führt. Durch einen Gentransfer von TIMP-1 und TIMP-3 zeigten van der Laan et al., 2003, dass die Knorpeldegradation und die Invasivität von FLS deutlich gesenkt werden kann.

#### 4.4 Beurteilung der Histologie

Anhand der Histologie konnte sich ein erster Eindruck über die dort stattfindenden Entzündungsprozesse gemacht werden. Erwartungsgemäß ist die akute Entzündung an Tag 1 und 3 nach Induktion der AIA am stärksten ausgeprägt und auch an Tag 7 noch deutlich zu registrieren, während am Tag 14 kaum noch Zeichen der akuten Entzündung auftreten. Die chronische Entzündung erreicht am Tag 7 nach Arthritisinduktion einen Maximalwert nach Arthritis-score-Bewertung, um im weiteren Verlauf der AIA wieder abzufallen. Das Ergebnis korreliert mit Arbeiten, welche ebenfalls eine Zunahme der Exsudation und Infiltration von Entzündungszellen in den ersten Tagen nach Induktion der AIA nachweisen konnten (van de Putte et al., 1983; Henzgen et al., 1996). Auch eine Zunahme der chronischen Entzündung und der damit verbundenen Destruktion der Gelenkoberfläche mit einem Maximum am Tag 7 nach Arthritisinduktion wurde beschrieben (Henzgen et al., 1996).

#### 4.5 Beurteilung der Immunhistochemie für MMP-3

Die Ergebnisse der Immunhistochemie zeigten, dass MMP-3 im Verlauf der AIA in den Chondrozyten vermehrt exprimiert wird. Eine Untersuchung von bovinem Knorpelgewebe zeigte unter dem Einfluß von proteolytisch generiertem Fibronectin die Schaffung eines katabolen Milieus, was unter anderem in einer vermehrten Expression von pro-MMP-3 in den Chondrozyten resultierte (Bewsey et al., 1996).

Desweiteren konnte in der akuten Phase ebenfalls im gesamten artikulären Bereich als auch

in den von einwandernden Zellen gebildeten Infiltrat eine verstärkte Färbung detektiert werden, was aber im Vergleich zur Isotypkontrolle nicht eindeutig abzugrenzen war. Ein eindeutigeres Ergebnis war unter den gegebenen Umständen nicht zu erzielen. Da kein primärer AK kommerziell erhältlich war, welcher nicht in einem murinen Organismus generiert wurde, erfolgte die Verwendung von primären monoklonalen Maus-AK auf Mausgewebe. Eine Arbeitsgruppe um E. Livne der Universität Haifa gelang nicht nur ein aussagekräftiges Ergebnis unter Verwendung dieses AK auf Mausgewebe, sie gelangten in tierexperimentellen Untersuchungen von Gelenkgewebe bei Umbauprozessen während des Wachstums ebenfalls zu dem Ergebnis, das neben den oberflächlichen Gelenkstrukturen auch Chondrozyten vermehrt MMP-3 exprimieren (Gepstein et al., 2002).

Dass aber auch weitere in dieser Arbeit nicht identifizierte Zellen an der vermehrten Expression von MMP-3 während der akuten Phase der AIA beteiligt sein können, implizieren verschiedene Untersuchungen, welche häufig der synovialen Deckzellschicht zumindest in der humanen RA diese Fähigkeit zusprechen (Case et al., 1990; Gravallesse et al., 1991). Neben den FLS und den Chondrozyten werden die Osteoklasten ebenfalls häufig in Zusammenhang mit MMP-3-Expression und knochendegradierenden Prozessen genannt (Case et al. 1989; Andersen et al., 2004).

Da Matrixmetalloproteinasen nach ihrer Biosynthese und posttranslationalen Prozessing sehr schnell sezerniert werden, gestaltet es sich häufig schwierig, ihren Expressionsursprung zu lokalisieren. Eine Möglichkeit sich trotz dieses Umstandes Orientierung zu verschaffen, bietet die Methode der *in situ*-Hybridisierung bzw. *in situ*-reverse transkription-polymerase chain reaction (*IS-RT-PCR*), mit welcher einer australischen Forschungsgruppe der Nachweis von einigen MMP's in humanen Brustkrebszelllinien gelang (Haupt et al., 2006).

#### 4.6 Schlussfolgerungen

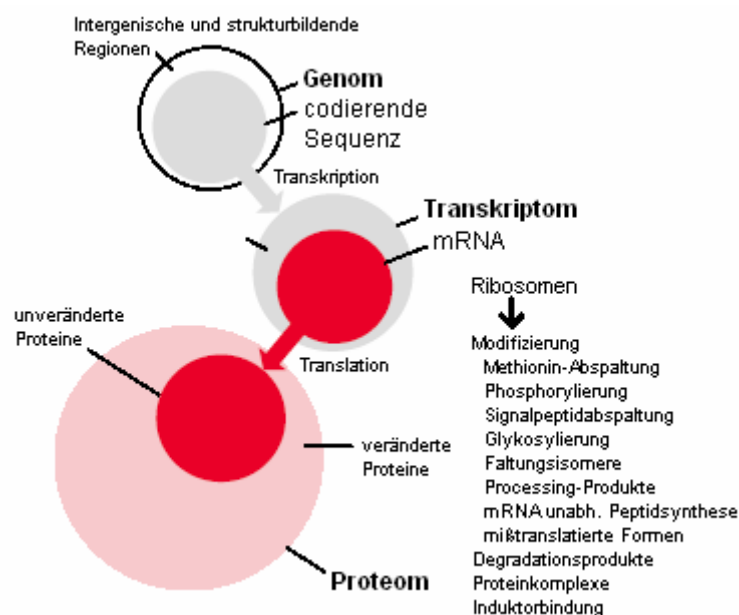
Diese Arbeit hat sich mit der Entwicklung eines low-density-Arrays beschäftigt, der anschließend zur Untersuchung von komplexen Erkrankungen unbekannter Ätiologie wie der RA eingesetzt werden konnte. Es sollte eine kostengünstige Plattform zur Untersuchung von Genexpressionsprofilen geschaffen werden, wofür nur eine Standardausrüstung benötigt wird. Letztlich wurde er zur Untersuchung der AIA im tierexperimentellen Modell herangezogen um die Proteinaseexpression der sich im Gelenk befindlichen und am Prozess der Entzündung beteiligten Strukturen zu analysieren. Es wurde versucht, eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der differentiellen Expression verschiedener Proteinasen zu machen. Anschließend erfolgte die Überprüfung ausgewählter Ergebnisse mittels Real Time PCR und im Falle von MMP-3 wurde noch eine Immunhistochemie zur Identifizierung der MMP-3 exprimierenden Zellen durchgeführt.

Aus den Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Die entwickelten cDNA-Arrays waren hybridisierbar, aber nicht voll aussagekräftig.
2. MMP-3 und TIMP-1 zeigten mit beiden Methoden eine Zunahme der Signalstärke in der akuten Phase der AIA bei Verwendung der direkt aus dem Gelenk isolierten RNA.
3. Die Immunhistochemie zeigte, dass Chondrozyten an der differentiellen Expression von MMP-3 in der akuten Phase der AIA beteiligt sind.
4. Die Probenzahlen waren zu gering, um verlässliche Ergebnisse mit beiden Methoden zu erhalten. Durch Erhöhung des Probenumfangs wurde die Aussagefähigkeit der Real Time PCR erhöht.
5. Fehlende Praxis in der Anwendung als auch aufwendige Hybridisierungsschritte erhöhten Artefaktanfälligkeit der cDNA-Arrays.
6. Kreuzhybridisierungen wurden nicht konsequent genug ausgeschlossen.
7. Die Markierung der zu untersuchenden Probe während der reversen Transkription hat sich als ungünstig erwiesen. Besser ist die Markierung der Probe nach der reversen Transkription während einer linearen Amplifikation unter Verwendung eines SPA-Primers.
8. Die Methode erlaubt kein dynamisches Verfolgen des Entwicklungsprozesses der Hybridisierungssignale. Deshalb ist es möglich, dass man zu einem bestimmten Zeitpunkt einige Signale noch nicht oder nicht mehr detektieren kann.
9. Wegen möglicher Kontamination der cDNA mit anderer DNA ist Verwendung von Plasmid-DNA oder Oligonukleotiden zum Arraydesign sinnvoller.
10. Mit der Entwicklung des Tube Array<sup>®</sup>, die zum Teil auf Erfahrungen dieser Arbeit aufbaute, wurden die Probleme bezüglich Arraydesign und Hybridisierung gelöst (Schüler et al., 2006).

## 4.7 Ausblick

Während die Anwendung von Oligonukleotid- und cDNA-Arrays zur Analyse von mRNA-Genexpressionsmustern schon fester Bestandteil der heutigen Forschung ist, gehen die Bestrebungen nun in die Richtung der Analyse von Proteinen und ihren Metaboliten. Auch wenn die Genexpressionsanalyse viele Informationen liefert, reicht die Methode alleine nicht aus, ein bestimmtes Gen oder sein Genprodukt als Therapieziel zu identifizieren. Folglich konzentrieren sich die weiteren Schritte zum einen auf die sogenannte Funktionsgenomik (engl. *functionomics*) mit dem Ziel, Zusammenhänge zwischen den erhaltenen Daten herzustellen, um Interaktionen aufzudecken, welche zu einem besseren Verständnis der Pathogenese einer Erkrankung und ihren Mechanismen führen soll (Neumann et al., 2004). Zum anderen ist die Erforschung des Proteom von großem wissenschaftlichen Interesse (Merrick 2003), um die Auswirkungen von Genexpressionänderungen auf Proteinebene weiterverfolgen und in Zusammenhang bringen zu können. Mit der Analyse einzelner Zellen hinsichtlich Expression, Proteinbiosynthese und ihrer Metaboliten wird der Trend der Miniaturisierung in der Forschung fortgesetzt. Dabei wurde der Begriff des Metabolom in Analogie zu Genom und Proteom geprägt, was alle charakteristischen Stoffwechself-Eigenschaften einer Zelle bzw. eines Gewebes zusammenfasst und dessen Erforschung die Wissenschaft vor neue Herausforderungen stellen wird.



**Abb. 48: Das Proteom als Resultat der Genexpression und nachfolgender Modifikation der entstandenen Proteinmoleküle.** nach <http://de.wikipedia.org/wiki/Proteom>

## 6 Literaturverzeichnis

**Adarichev V.A., Vermes C., Hanyecz A., Mikecz K., Bremer E.G., Glant T.T.** (2005) Gene Expression profiling in murine autoimmune arthritis during the initiation and progression of joint inflammation. *Arthritis Res. Ther.*, 7(2): 196-207.

**Andersen T.L., del Carmen Ovejero M., Kirkegaard T., Lenhard T., Foged N.T., Delaisse J.M.** (2004) A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. *Bone*, 35(5): 1107-1119.

**Barrett A.J., Rawlings N.D.** (1991) Types and families of endopeptidases. *Biochem. Soc. Trans.*, 19(3): 707-715.

**Barrett A.J., Rawlings N.D., Davies M.E., Machleidt W., Salvesen G., Turk V.** (1986) Cysteine proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. In: Dingle J.T., Gordon J.L., eds. *Research monographs in cell and tissue physiology*. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier Science Publishers BV, Vol. 12: 515-569.

**Berdowska I.** (2004) Cysteine proteases as disease markers. *Clin. Chim. Acta.*, 342(1-2): 41-69.

**Bewsey K.E., Wen C., Purple C., Homandberg G.A.** (1996) Fibronectin fragments induce the expression of stromelysin-1 mRNA and protein in bovine chondrocytes in monolayer culture. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1317(1): 55-64.

**Bohley P., Segeln P.O.** (1992) Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia*, (48): 151-156.

**Bracke K., Cataldo D., Maes T., Gueders M., Noel A., Foidart J.M., Brusselle G., Pauwels R.A.** (2005) Matrix metalloproteinase-12 and cathepsin D expression in pulmonary macrophages and dendritic cells of cigarette smoke-exposed mice. *Int. Arch Allergy Immunol.*, 138(2): 169-179. Epub 2005 Sep 2

**Bräuer R., Kette H., Henzgen S., Thoss K.** (1994) Influence of cyclosporin A on cytokine levels in synovial fluid and serum of rats with antigen-induced arthritis. *Agents Actions*, 41(1-2): 96-98.

**Bramhall S.R., Neoptolemos J.P., Stamp G.W., Lemoine N.R.** (1997) Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol.*, 182(3):347-355.

**Bromme D., Bonneau P.R., Lachance P., Wiederanders B., Kirschke H., Peters C., Thomas D.Y., Storer A.C., Vernet T.** (1993) Functional expression of human cathepsin S in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of the recombinant enzyme. *J. Biol. Chem.*, 268(7): 4832-4838.

**Bromme D., Okamoto K., Wang B.B., Biroc S.** (1996) Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 271(4): 2126-2132.

- Budihna M., Strojjan P., Smid L., Skrk J., Vrhovec I., Zuperc A., Rudolf Z., Zargi M., Krasovec M., Svetic B., Kopitar-Jerala N., Kos J.** (1996) Prognostic value of cathepsins B, H, L, D and their endogenous inhibitors stefins A and B in head and neck carcinoma. *Biol Chem. Hoppe Seyler*, 377(6): 385-390.
- Carty S.M., Snowden N., Silman A.J.** (2004) Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis? *Ann. Rheum. Dis.*, 63: 46-49.
- Case J.P., Lafyatis R., Kumkumian G.K., Remmers E.F., Wilder R.L.** (1990) IL-1 regulation of transin/stromelysin transcription in rheumatoid synovial fibroblasts appears to involve two antagonistic transduction pathways, an inhibitory, prostaglandin-dependent pathway mediated by cAMP, and a stimulatory, protein kinase C-dependent pathway. *J Immunol.*, 145(11): 3755-3761.
- Case J.P., Sano H., Lafyatis R., Remmers E.F., Kumkumian G.K., Wilder R.L.** (1989) Transin/stromelysin expression in the synovium of rats with experimental erosive arthritis. In situ localization and kinetics of expression of the transformation-associated metalloproteinase in euthymic and athymic Lewis rats. *J Clin Invest.*, 84(6): 1731-1740.
- Chen C.H., Lin K.C., Yu D.T., Yang C., Huang F., Chen H.A., Liang T.H., Liao H.T., Tsai C.Y., Wei J.C., Chou C.T.** (2006) Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ankylosing spondylitis: MMP-3 is a reproducibly sensitive and specific biomarker of disease activity. *Rheumatology (Oxford)*, 45(4): 414-420. Epub 2005 Nov 15
- Deryugina E.I., Quigley J.P.** (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, 25(1): 9-34.
- Drobyshev A.L., Machka C., Horsch M., Seltmann M., Liebscher V., Hrabe de Angelis M., Beckers J.** (2003) Specificity assessment from fractionation experiments (SAFE): a novel method to evaluate microarray probe specificity based on hybridisation stringencies. *Nucleic Acids Res.*, 31(2): E1-1.
- Dreier R., Wallace S., Fuchs S., Bruckner P., Grassel S.** (2001) Paracrine interactions of chondrocytes and macrophages in cartilage degradation: articular chondrocytes provide factors that activate macrophage-derived pro-gelatinase B (pro-MMP-9). *J. Cell Sci.* 114(21): 3813-3822.
- Dugernier T., Laterre P.F., Reynaert M., Deby-Dupont G.** (2005) Compartmentalization of the protease-antiprotease balance in early severe acute pancreatitis. *Pancreas*, 31(2): 168-173.
- Fini M.E., Cook J.R., Mohan R., Brinckerhoff C.E.** (1998) Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *Matrix Metalloproteinases*. Parks W.C., Mecham R.P. (eds.), New York, Academic Press: 299-356.
- Fotin A.V., Drobyshev A.L., Proudnikov D.Y., Perov A.N., Mirzabekov A.D.** (1998) Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips. *Nucleic Acids Res.*, 26(6): 1515-1521.
- Frisch S.M., Ruley H.E.** (1987) Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *J. Biol. Chem.*, 262: 16300-16304.

- Gabrijelcic D., Annan-Prah A., Rodic B., Rozman B., Cotic V., Turk V.** (1990) Determination of cathepsins B and H in sera and synovial fluids of patients with different joint diseases. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 28 (3): 149-153.
- Gay S., Gay R.E., Koopman W.J.** (1993) Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann. Rheum. Dis.*, 52: 39-47.
- Gelb B.D., Shi G.P., Chapman H.A., Desnick R.J.** (1996) Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*, 273 (5279): 1236-1238.
- Gepstein A., Shapiro S., Arbel G., Lahat N., Livne E.** (2002) Expression of matrix metalloproteinases in articular cartilage of temporomandibular and knee joints of mice during growth, maturation, and aging. *Arthritis Rheum.*, 46(12): 3240-3250.
- Grant E.P., Pickard M.D., Briskin M.J., Gutierrez-Ramos J.C.** (2002) Gene Expression profiles: creating new perspectives in arthritis research. *Arthritis Rheum.*, 46 (4): 859-861.
- Gravallese E.M., Darling J.M., Ladd A.L., Katz J.N., Glimcher L.H.** (1991) In situ hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.*, 34(9): 1076-1084.
- Hansen T., Petrow P.K., Gaumann A., Keyszer G.M., Eysel P., Eckardt A., Brauer R., Kriegsmann J.** (2000) Cathepsin B and its endogenous inhibitor cystatin C in rheumatoid arthritis synovium. *J. Rheumatol.*, 27(4): 859-865.
- Hardingham T.E., Fosang A.J.** (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.*, 6(3): 861-870.
- Haupt L.M., Thompson E.W., Trezise A.E., Irving R.E., Irving M.G., Griffiths L.R.** (2006) In vitro and in vivo MMP gene expression localisation by In Situ-RT-PCR in cell culture and paraffin embedded human breast cancer cell line xenografts. *BMC Cancer*, 6: 18.
- Hegemann N., Wondimu A., Ullrich K., Schmidt M.F.** (2003) Synovial MMP-3 and TIMP-1 levels and their correlation with cytokine expression in canine rheumatoid arthritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 91(3-4): 199-204.
- Henrickson S.E., Hartmann E.M., Ott G., Rosenwald A.** (2007) Gene expression profiling in malignant lymphomas. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 593: 134-146.
- Henskens Y.M., Veerman E.C., Nieuw Amerongen A.V.** (1996) Cystatins in health and disease. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 377(2): 71-86.
- Henzgen S., Petrow P.K., Thoss K., Bräuer R.** (1996) Degradation of articular cartilage during the progression of antigen-induced arthritis in mice. A scanning and transmission electron microscopic study. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 48(4): 255-263.
- Hollander A.P., Heathfield T.F., Webber C., Iwata Y., Bourne R., Rorabeck C., Poole A.R.** (1994) Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J. Clin. Invest.*, 93(4): 1722-1732.
- Hou W.S., Li Z., Buttner F.H., Bartnik E., Bromme D.** (2003) Cleavage site specificity of cathepsin K toward cartilage proteoglycans and protease complex formation. *Biol. Chem.*, 384(6): 891-897.

- Hummel K.M., Petrow P.K., Franz J.K., Muller-Ladner U., Aicher W.K., Gay R.E., Bromme D., Gay S.** (1998) 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.*, 25(10): 1887-1894.
- Ihn H., Yamane K., Asano Y., Kubo M., Tamaki K.** (2002) IL-4 up-regulates the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in dermal fibroblasts via the p38 mitogen-activated protein kinase dependent pathway. *J. Immunol.*, 168 (4): 1895-902.
- Ikeda Y., Ikata T., Mishiro T., Nakano S., Ikebe M., Yasuoka S.** (2000) Cathepsins B and L in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and the effect of cathepsin B on the activation of pro-urokinase. *J. Med. Invest.*, 47(1-2): 61-75.
- Itoh T., Matsuda H., Tanioka M., Kuwabara K., Itohara S., Suzuki R.** (2002) The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J. Immunol.*, 169 (5): 2643-2647.
- Iwata H., Kobayashi S., Iwase H., Okada Y.** (1995) The expression of MMPs and TIMPs in human breast cancer tissues and importance of their balance in cancer invasion and metastasis. *Nippon Rinsho.*, 53(7): 1805-1810.
- Jedeszko C. & Sloane B.F.** (2004) Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol. Chem.*, 385(11): 1017-1027.
- John A., Tuszynski G.** (2001) The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol. Oncol. Res.*, 7(1): 14-23.
- Kamolmatyakul S., Chen W., Li Y.P.** (2001) Interferon-gamma down-regulates gene expression of cathepsin K in osteoclasts and inhibits osteoclast formation. *J. Dent. Res.*, 80(1): 351-355.
- Karouzakis E., Neidhart M., Gay R.E., Gay S.** (2006) Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol. Lett.*, 106(1): 8-13. Epub 2006 May 24.
- Kasama T., Shiozawa F., Kobayashi K., Yajima N., Hanyuda M., Takeuchi H.T., Mori Y., Negishi M., Ide H., Adachi M.** (2001) Vascular endothelial growth factor expression by activated synovial leukocytes in rheumatoid arthritis: critical involvement of the interaction with synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.*, 44(11): 2512-2524.
- Kerkela E., Ala-aho R., Klemi P., Grenman S., Shapiro S.D., Kahari V.M., Saarialho-Kere U.** (2002) Metalloelastase (MMP-12) expression by tumour cells in squamous cell carcinoma of the vulva correlates with invasiveness, while that by macrophages predicts better outcome. *J. Pathol.*, 198(2): 258-269.
- Keyszer G., Lambiri I., Nagel R., Keyszer C., Keyszer M., Gromnica-Ihle E., Franz J., Burmester G.R., Jung K.** (1999) Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1), and MMP-1/TIMP-1 complex in rheumatic disease. Correlation with clinical activity of rheumatoid arthritis versus other surrogate markers. *J. Rheumatol.*, 26(2) :251-258. Comment in: *J Rheumatol.*, 1999; 26(10): 2281-2282.



- Keyszer G., Redlich A., Haupl T., Zacher J., Sparmann M., Engethum U., Gay S., Burmester G.R.** (1998) Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Arthritis Rheum.*, 41 (8): 1378-1387.
- Kieseier B.C., Paul R., Koedel U., Seifert T., Clements J.M., Gearing A.J., Pfister H.W., Hartung H.P.** (1999) Differential expression of matrix metalloproteinases in bacterial meningitis. *Brain.*, 122 (8): 1579-1587.
- Kirschke H., Barrett A.J., Rawlings N.D.** (1995) Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein-Profile*, 2(14): 1581-1643.
- Kirschke H., Wiederanders B., Bromme D., Rinne A.** (1989) Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem. J.*, 264(2): 467-473.
- Lee D.M., Kiener H.P., Agarwal S.K., Noss E.H., Watts G.F., Chisaka O., Takeichi M., Brenner M.B.** (2007) Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science*, 315(5814): 1006-1010.
- Lemaire R., Huet G., Zerimech F., Grard G., Fontaine C., Duquesnoy B., Flipo R.M.** (1997) Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. *Br. J. Rheumatol.*, 36(7): 735-743.
- Lemere C.A., Munger J.S., Shi G.P., Natkin L., Haass C., Chapman H.A., Selkoe D.J.** (1995) The lysosomal cysteine protease, cathepsin S, is increased in Alzheimer's disease and Down syndrome brain. An immunocytochemical study. *Am. J. Pathol.*, 146(4): 848-860.
- Lenarcic B., Gabrijelcic D., Rozman B., Drobnic-Kosorok M., Turk V.** (1988) Human cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors (CPIs) in inflammatory and metabolic joint diseases. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 369 Suppl: 257-261.
- Lokeshwar B.L., Selzer M.G., Block N.L., Gunja-Smith Z.** (1993) Secretion of matrix metalloproteinases and their inhibitors (tissue inhibitor of metalloproteinases) by human prostate in explant cultures: reduced tissue inhibitor of metalloproteinase secretion by malignant tissues. *Cancer Res.*, 53(19): 4493-4498.
- Martel-Pelletier J., McCollum R., Fujimoto N., Obata K., Cloutier J.M., Pelletier J.P.** (1994) Excess of metalloproteinases over tissue inhibitor of metalloproteinase may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab. Invest.*, 70(6): 807-815.
- Merrick B.A.** (2003) Proteomics The human proteome organization (HUPO) and environmental health. *EHP Toxicogenomics*, 111(1T): 1-5.
- Miao F., Wu X., Zhang L., Yaun Y.C., Riggs A.D., Natarajan R.** (2007) Genome-wide analysis of histone lysine methylation variations caused by diabetic conditions in human monocytes. *J. Biol. Chem.*[Epub ahead of print]
- Mignatti P., Rifkin D.B.** (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.*, 73(1): 161-195.

- Mishiro T., Nakano S., Takahara S., Miki M., Nakamura Y., Yasuoka S., Nikawa T., Yasui N.** (2004) Relationship between cathepsin B and thrombin in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 31(7): 1265-1273.
- Mitchell K.M., Hale R.J., Buckley C.H., Fox H., Smith D.** (1993) Cathepsin-D expression in cervical carcinoma and its prognostic significance. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, 422(5): 357-360.
- Mort J.S., Billington C.J.** (2001) Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation, *Arthritis Res.*, 3(6): 337-341.
- Motyckova G., Fisher D.E.** (2002) Pycnodysostosis: role and regulation of cathepsin K in osteoclast function and human disease. *Curr. Mol. Med.*, 2(5): 407-421. Review.
- Murai C., Munakata Y., Takahashi Y., Ishii T., Shibata S., Muryoi T., Funato T., Nakamura M., Sugamura K., Sasaki T.** (1999) Rheumatoid arthritis after human parvovirus B19 infection. *Ann. Rheum. Dis.*, 58(2): 130-132.
- Neumann E., Gay R.E., Gay S., Müller-Ladner U.** (2004) Functional genomics of fibroblasts. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 16(3): 238-245.
- Ogata Y., Enghild J.J., Nagase H.** (1992) Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J. Biol. Chem.*, 267(6): 3581-3584.
- Ospelt C., Neidhart M., Gay R.E., Gay S.** (2004) Synovial activation in rheumatoid arthritis. *Front Biosci.*, 9: 2323-2334.
- Perlman H., Pagliari L.J., Volin M.V.** (2001) Regulation of apoptosis and cell cycle activity in rheumatoid arthritis. *Curr. Mol. Med.*, 1(5): 597-608.
- Petrow P.K., Thoss K., Henzgen S., Katenkamp D., Bräuer R.** (1996) Limiting dilution analysis of the frequency of autoreactive lymph node cells isolated from mice with antigen-induced arthritis. *J. Autoimmun.*, 9(5): 629-635.
- Premzl A., Zavasnik-Bergant V., Turk V., Kos J.** (2003) Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. *Exp. Cell. Res.*, 283(2): 206-214.
- Riese R.J., Wolf P.R., Bromme D., Natkin L.R., Villadangos J.A., Ploegh H.L., Chapman H.A.** (1996) Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity*, 4(4): 357-366.
- Rosenberg G.A.** (2002) Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia*, 39(3): 279-291.
- Schüler S., Wenz I., Wiederanders B., Slickers P., Ehrlich R.** (2006) An alternative method to amplify RNA without loss of signal conservation for expression analysis with a proteinase DNA microarray in the ArrayTube format. *BMC Genomics*, 7:144.

- Schurigt U., Stopfel N., Huckel M., Pfirschke C., Wiederanders B., Brauer R.** (2005) Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins, and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 7(1): 174-188.
- Shaheen R.M., Miseljic S., Wiehle R.D., Wittliff J.L. (1995) Relation between cathepsin D expression and other prognostic factors in breast carcinomas. *Clin. Chem.*, 41(11): 1585-1591.
- Silman A.J., MacGregor A.J., Thomson W., Holligan S., Carthy D., Farhan A., Ollier W.E.** (1993) Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br. J. Rheumatol.*, 32(10): 903-907.
- Sloane B.F., Honn K.V.** (1984) Cysteine proteinases and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, 3(3): 249-263.
- Smago Y.** (2005) Charakterisierung der Antigen-induzierten Arthritis in Cathepsin K defizienten Mäusen. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doktor medicinae vorgelegt an der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Spiegel S., Foster D., Kolesnick R.** (1996) Signal transduction through lipid second messengers. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8(2): 159-167.
- Sternlicht M.D., Werb Z.** (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 17: 463-516.
- Sültmann H., Wellenreuther R., Wiemann S., Argo S., Poustka A.** (2005) Hochdurchsatz gegen den Krebs: Gemeinsam geht's besser! GENOMXPRESS 1.05 Informationen aus der deutschen Genomforschung, 9-11.
- Sukoh N., Abe S., Ogura S., Isobe H., Takekawa H., Inoue K., Kawakami Y.** (1994) Immunohistochemical study of cathepsin B. Prognostic significance in human lung cancer. *Cancer*, 74(1): 46-51.
- Takahara Y., Takahashi M., Wagatsuma H., Yokoya F., Zhang Q.W., Yamaguchi M., Aburatani H., Kawada N.** (2006) Gene expression profiles of hepatic cell-type specific marker genes in progression of liver fibrosis. *World J. Gastroenterol.*, 12(40): 6473-6499.
- Tezuka K., Tezuka Y., Maejima A., Sato T., Nemoto K., Kamioka H., Hakeda Y., Kumegawa M.** (1994) Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *J. Biol. Chem.*, 269(2): 1106-1109.
- Tsui F.W., Tsui H.W., Mok S., Mlinaric I., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Siminovitch K.A.** (1993) Molecular characterization and mapping of murine genes encoding three members of the stefin family of cysteine proteinase inhibitors. *Genomics.*, 15(3): 507-514.
- Uchiyama Y., Waguri S., Sato N., Watanabe T., Ishido K., Kominami E.** (1994) Cell and tissue distribution of lysosomal cysteine proteinases. *Acta Histochem. Cytochem.*, 27(4): 287-308.
- van de Putte L.B., Lens J.W., van den Berg W.B., Kruijsen M.W.** (1983) Exacerbation of antigen-induced arthritis after challenge with intravenous antigen. *Immunology*, 49(1): 161-167.

**van der Laan W.H., Quax P.H., Seemayer C.A., Huisman L.G., Pieterman E.J., Grimbergen J.M., Verheijen J.H., Breedveld F.C., Gay R.E., Gay S., Huizinga T.W., Pap T.** (2003) Cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by gene transfer of TIMP-1 and TIMP-3. *Gene Ther.*, 10(3): 234-242.

**van Meurs J., van Lent P., Holthuysen A., Lambrou D., Bayne E., Singer I., van den Berg W.** (1999) Active matrix metalloproteinases are present in cartilage during immune complex-mediated arthritis: a pivotal role for stromelysin-1 in cartilage destruction. *J. Immunol.*, 163(10): 5633-5639.

**Wang B., Shi G.P., Yao P.M., Li Z., Chapman H.A., Bromme D.** (1998) Human cathepsin F. Molecular cloning, functional expression, tissue localization, and enzymatic characterization. *J.Biol.Chem.*, 273(48): 32000-32008.

**Wille A.** (2002) Untersuchungen des Einflusses der antisense-Inhibierung von Kathepsin L auf die funktionelle Aktivität von Lungenepithelzellen. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium vorgelegt an der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

**Weis-Klemm M., Alexander D., Pap T., Schutzle H., Reyer D., Franz J.K., Aicher W.K.** (2004) Synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients differ in their regulation of IL-16 gene activity in comparison to osteoarthritis fibroblasts. *Cell Physiol. Biochem.*, 14(4-6): 293-300.

**Wojtowicz-Praga S.M., Dickson R.B., Hawkins M.J.** (1997) Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs*, 15(1): 61-75.

**Wu Z.Y., Li J.H., Zhan W.H., He Y.L.** (2006) Lymph node micrometastasis and its correlation with MMP-2 expression in gastric carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 12(18): 2941-2944.

**Yanni G., Whelan A., Feighery C., Bresnihan B.** (1994) Synovial tissue macrophages and joint erosion in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 53(1): 39-44.

**Yasuda Y., Kaleta J., Bromme D.** (2005) The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57(7): 973-993. Epub 2005 Apr 15.

**Yoshihara Y., Nakamura H., Obata K., Yamada H., Hayakawa T., Fujikawa K., Okada Y.** (2000) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 59(6): 455-461.

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:  
Prof. Dr. Bernd Wiederanders, Dr. Uta Schurigt, Annett Kreusch, Prof. Dr. Rolf Bräuer
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Geisa, den 18.07.2007

Nadine Stopfel, Verfasserin

## **Lebenslauf**

### **Zur Person**

Name: Nadine Stopfel  
Geburtsdatum/ -ort: 24.12.1976 in Bad Salzungen  
Familienstand: ledig, 1 Tochter

### **Schulbildung**

1983 – 1991 Polytechnische Oberschule Stadtlengsfeld  
1991 – 1995 Staatliches Gymnasium Vacha  
Abschluß Abitur

### **Studium**

1995 – 2002 Studium der Humanmedizin an der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Abschluß Staatsexamen

### **Beruflicher Werdegang**

9/ 2003 – 9/ 2004 Ärztin im Praktikum an der Klinik für Anästhesiologie und  
Intensivmedizin der Zentralklinik Bad Berka GmbH  
10/ 2004 – 7/ 2005 Assistenzärztin an der Klinik für Anästhesiologie und Intensiv-  
medizin der Zentralklinik Bad Berka GmbH  
seit 10/ 2006 Assistenzärztin an der Klinik für Anästhesiologie, Intensiv- und  
Nofallmedizin des Klinikum Fulda gAG

### **Dissertation**

„Entwicklung muriner cDNA-Arrays zur Bestimmung der Proteinase-Expression arthritischer  
Fibroblasten im Modell der Antigen-induzierten Arthritis“

seit 5/ 2000 Doktorand am Institut für Biochemie I unter Betreuung von  
Prof. Dr. Wiederanders und in der AG Immunpathologie des  
Instituts für Pathologie unter Leitung von Prof. Dr. Bräuer  
6/ 2002 – 5/ 2003 Promotionsstipendium des Interdisziplinären Zentrums für  
Klinische Forschung Jena

Geisa, den 18.07.2007

## **Danksagung**

Die vorliegende Promotionsarbeit wurde am Institut für Biochemie I sowie am Institut für Pathologie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena erstellt. Ich möchte allen meinen Dank aussprechen, die mich während dieser Zeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wiederanders für die Bereitstellung des Themas und die individuelle Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit. Die Arbeiten am Institut für Biochemie I wurden vor allem von Fr. Kreuzsch und Fr. Seul betreut. Ihnen möchte ich ein großes Dankeschön aussprechen.

Während der experimentellen Arbeiten am Institut für Pathologie stand mir vor allem Fr. Dr. Schurig immer mit Rat und Tat zur Seite. Ihr und der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bräuer gilt mein herzlichster Dank.

Für die Vergabe eines Promotionsstipendiums, welches mir die Fortführung der experimentellen Arbeiten auch nach Beendigung meines Studiums ermöglichte, bedanke ich mich beim Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Last but not least gilt mein Dank natürlich meiner Familie, meinen Eltern und meiner Schwester sowie meinem Oliver und unserer Emma. Ich liebe Euch.